

Zeitliche Koordination in Cyanobakterien – Untersuchungen zu Kai-Proteinen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Anika Wiegard

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekanin/Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Wolfgang Lockau
2. Jun.-Prof. Dr. Ilka Maria Axmann
3. Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2015

Denn Zeit ist Leben. Und das Leben wohnt im Herzen.

Micheal Ende

Zusammenfassung

Viele Organismen steuern ihre Aktivitäten im Einklang mit den täglichen Veränderungen ihrer Umwelt. Für *Synechococcus elongatus* PCC 7942 wurde eine vorausschauende Regulation durch eine circadiane Uhr nachgewiesen. Dieser liegt ein Oszillator zugrunde, der aus nur drei Proteinen besteht: KaiA, KaiB und KaiC. Durch zyklische Wechselwirkungen werden 24stündige Phosphorylierungs- und ATPase-Zyklen des KaiC erzeugt, welche wiederum u. a. die globale Genaktivität steuern. Neben Anzahl und Organisation der *kai*-Gene scheint auch die Zahl an circadian regulierten Genen in Cyanobakterien stark zu variieren. Die circadiane Rhythmik kann zudem evolutionär verloren gegangen sein oder abhängig von den Umgebungsbedingungen ein- und ausgeschaltet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde *Synechocystis* sp. PCC 6803 als Modell ausgewählt, um die Komponenten eines potenziell komplexeren Kai-Systems zu untersuchen. Neben einem *kaiA*-Gen enthält dessen Genom jeweils drei *kaiB*- und *kaiC*-Gene, die für divergierte Proteine kodieren. Durch *in vitro* Studien wurde die Aktivität von KaiC1 und KaiC3 erstmals charakterisiert: KaiC1 zeigte eine von KaiA abhängige Kinase-Aktivität und bildet - gestützt durch Sequenzanalysen – mit KaiA und KaiB1 vermutlich einen „Standard-Oszillator“. KaiC3 wies die typischen Kinase-, ATP-Synthase und ATPase-Aktivitäten des KaiC aus *Synechococcus* auf. Deren Ausprägung erschien jedoch modifiziert. Weder KaiA noch die drei KaiB-Proteine konnten den Phosphorylierungsgrad des KaiC3 beeinflussen. Ferner wurde durch spezifisch gerichtete Antikörper die zeitliche und räumliche intrazelluläre Verteilung des KaiA sowie der KaiC-Proteine aufgeklärt. In Hell-Dunkelrhythmen und unter Freilaufbedingungen waren die Proteine nahezu konstant nachweisbar und lagen größtenteils membranassoziiert vor. TEM-Analysen demonstrierten, dass der nicht-lösliche Anteil des KaiA und KaiC3 nachts an den Thylakoidmembranen vorliegt. KaiC1 könnte zudem an der Cytoplasmamembran lokalisieren. Trotz nachgewiesener *in vitro* Phosphorylierung wurden *in vivo* keine deutlichen Phosphorylierungsrhythmen der KaiC-Proteine gefunden. Insgesamt verhielten sich die Kai-Proteine abweichend von den Homologen aus *Synechococcus*, was das Fehlen einer circadianen Rhythmik unter den gewählten Wachstumsbedingungen erklärt. Angesichts kontroverser Diskussionen über die molekularen Details der Assemblierung von KaiC und KaiB aus *Synechococcus* wurde in einem ergänzenden Projekt demonstriert, dass die gesteigerte Auto-Phosphorylierung des KaiC bei 4 °C zur Bildung stabiler KaiC-KaiB-Komplexe führt. Die dabei etablierte Methode erlaubt Untersuchungen der KaiC-KaiB-Interaktion unter Verwendung der Wildtyp-Proteine. Daten aus daraus erstmals abgeleiteten Experimenten werden diskutiert.

Abstract

Many organisms coordinate their activities according to daily environmental changes. For *Synechococcus elongatus* PCC 7942 foresighted regulation has been demonstrated. The underlying oscillator consists of only three proteins: KaiA, KaiB and KaiC. By means of cyclic interactions 24-hour phosphorylation and ATPase cycles of KaiC are generated, which in turn control global gene activity. The number and organization of *kai*-genes as well as the number of circadian regulated genes seem to vary strongly among cyanobacteria. Circadian rhythmicity may further get lost during evolution or can be shut on and off, depending on the environmental conditions. In the present study *Synechocystis* sp. PCC 6803 was chosen as a model to analyse the components of a probably more complex Kai-system. In addition to one *kaiA*-gene its genome contains each three *kaiB*- and *kaiC*-genes, which are encoding diverged Kai proteins. The activity of KaiC1 and KaiC3 was – for the first time - characterized by *in vitro* studies: KaiC1 displayed a KaiA-dependent kinase activity and builds a ‘standard oscillator’ together with KaiA and KaiB1, which is supported by *in silico* sequence analyses. KaiC3 displayed the typical kinase, ATP synthase and ATPase activities of KaiC from *Synechococcus*. However, the characteristics of the activities appeared to be modified. Neither KaiA nor the three KaiB proteins affected the phosphorylation state of KaiC3. Moreover, the temporal and spatial intracellular distribution of KaiA and the KaiC proteins was elucidated using specifically targeted antibodies. In light-dark rhythms and under free-running conditions the proteins were detected at nearly constant levels and were mainly found membrane-associated. TEM-analyses demonstrated that the insoluble part of KaiA and KaiC3 is present at the thylakoid membranes during the night. KaiC1 might also localize to the cytosolic membrane. Although phosphorylation has been clearly demonstrated *in vitro*, evidence for rhythmic *in vivo* phosphorylation cycles could not be provided. Altogether, the Kai proteins performed different from their *Synechococcus* homologs, explaining the lack of circadian rhythms under the chosen growth conditions. In view of the controversial discussions about the assembly of KaiC and KaiB from *Synechococcus*, an additional project was set up to demonstrate that increased auto-phosphorylation of KaiC at 4 °C leads to the formation of stable KaiC-KaiB-complexes. In this context, a protocol was established that allows to analyse KaiC-KaiB interactions using wild-type proteins. Data from derived experiments will be discussed.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	i
Tabellenverzeichnis	iii
1. Einleitung	1
1.1 Circadiane Rhythmen	1
1.2 Circadiane Rhythmen in Prokaryoten – Erste Entdeckungen	3
1.3 Die circadiane Uhr von <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	4
1.3.1 <i>In vivo</i> Oszillation der <i>kai</i> -Genprodukte	4
1.3.2 Der posttranslationale Oszillator	7
1.3.2.1 Das KaiC-Protein	8
1.3.2.2 Circadiane Phosphorylierung und Dephosphorylierung	9
1.3.2.3 Circadiane (Netto-)ATPase-Aktivität	12
1.3.2.4 Intrazelluläre Synchronisierung der KaiC-Aktivitäten	13
1.3.3 Der PTO ist eingebettet in einen TTFL	14
1.3.4 Der PTO steuert den globalen <i>Output</i>	16
1.3.5 <i>Entrainment</i> des Oszillators	18
1.4 Cyanobakterielle Vielfalt – Auch in der zeitlichen Koordination?	20
1.5 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 - ein Repräsentant mit multiplen <i>kai</i> -Genen	22
1.6 Ziel der Arbeit	25
2. Ergebnisse.....	26
2.1 <i>In vitro</i> Untersuchungen zur Phosphorylierung und Komplexbildung des KaiC ₇₉₄₂ bei niedrigen Temperaturen.....	26
2.2 Charakterisierung der multiplen Kai Proteine in <i>Synechocystis</i>	31
2.2.1 <i>In silico</i> Vorhersagen zu den multiplen Kai-Proteinen in <i>Synechocystis</i>	31
2.2.2 <i>In vitro</i> Studien zur Aktivität der multiplen Kai-Proteine in <i>Synechocystis</i>	38
2.2.2.1 Heterologe Expression und Reinigung der Kai-Proteine.....	38
2.2.2.2 KaiA ₆₈₀₃ und KaiB1 können ihre <i>Synechococcus</i> Orthologe bezüglich der Regulation der Phosphorylierung von KaiC ₇₉₄₂ ersetzen.....	39
2.2.2.3 KaiC1 besitzt eine durch KaiA stimulierbare Autokinase-Aktivität	41
2.2.2.4 KaiC3 zeigt eine von KaiA unabhängige Kinase-Aktivität	42
2.2.2.5 KaiC3 synthetisiert ATP	45
2.2.2.6 KaiC3 besitzt eine ATPase-Aktivität	47
2.2.3 <i>In vivo</i> Verhalten der multiplen Kai-Proteine in <i>Synechocystis</i>	48
2.2.3.1 Kultivierung von <i>Synechocystis</i> unter diurnalen und circadianen Bedingungen	49
2.2.3.2 Generierung spezifischer Antikörper	53
2.2.3.3 Zeitliche Akkumulation der Kai Proteine	55

2.2.3.4	Zeitliche Lokalisation der Kai-Proteine.....	58
2.2.3.5	Untersuchungen zur räumlichen Verteilung der Kai-Proteine bei photoautotrophem und mixotrophem Wachstum.....	60
2.2.3.5.1	Photoautotrophe und mixotrophe Kultivierung von <i>Synechocystis</i> in LD...	60
2.2.3.5.2	Membranassoziation des KaiA ₆₈₀₃ und der KaiC-Proteine bei photoautotrophem und mixotrophem Wachstum.....	62
2.2.3.5.3	Verteilung von KaiA ₆₈₀₃ und KaiC3 in der Zelle	64
2.2.3.5.4	Lokalisation von KaiC1	71
2.2.3.5.5	Abundanz von KaiA ₆₈₀₃ und KaiC3 bei photoautotrophem und mixotrophem Wachstum	73
2.2.3.6	<i>In vivo</i> Phosphorylierung der KaiC-Proteine	75
3.	Diskussion.....	78
3.1	Der <i>Synechococcus</i> PTO – Untersuchungen zum KaiC-KaiB-Komplex.....	78
3.1.1	KaiC bildet bei 4 °C aufgrund der erhöhten Phosphorylierung stabile Komplexe mit KaiB.....	79
3.1.2	Sechs KaiB-Monomere binden über ihre helikale Fläche an den CII-Ring von KaiC.....	82
3.1.3	Ausblick: weiterführende Analysen zum KaiC-KaiB-(KaiA)-Komplex	85
3.2	Multiple Kai-Proteine in <i>Synechocystis</i>	86
3.2.1	Biochemische Eigenschaften der multiplen Kai-Proteine aus <i>Synechocystis</i> ...	86
3.2.1.1	Expression und Reinigung der Kai-Proteine aus <i>Synechocystis</i>	87
3.2.1.2	KaiC1, KaiC2 und KaiC3 zeigen eine <i>in vitro</i> Phosphorylierung.....	87
3.2.1.3	Die <i>in vitro</i> Aktivitäten des KaiC3 sind im Vergleich zu KaiC ₇₉₄₂ modifiziert.....	88
3.2.1.4	KaiB1 und KaiB3 interagieren mit KaiC ₇₉₄₂	90
3.2.1.5	Schlussbetrachtung zur <i>in vitro</i> Aktivität der multiplen Kai-Proteine.....	91
3.2.2	Zeitliche Koordination in <i>Synechocystis</i> bei langsamem Wachstum	93
3.2.3	Das Verhalten der <i>kai</i> -Genprodukte unterscheidet sich von den <i>Synechococcus</i> Orthologen	95
3.2.3.1	Die <i>kai</i> -Transkripte zeigen diurnale Oszillationen	96
3.2.3.2	KaiA ₆₈₀₃ und die KaiC-Proteine liegen konstant in der Zelle vor	97
3.2.3.3	Bei langsamem Wachstum zeigen die KaiC-Proteine keine deutlichen Phosphorylierungszyklen.....	99
3.2.3.4	Lokalisation der Kai-Proteine	100
3.2.4	Schlussbetrachtung - Konditionelle circadiane Rhythmik in <i>Synechocystis</i> ?	102
4.	Material und Methoden	106
4.1	Material.....	106
4.1.1	Technische Laborgeräte.....	106
4.1.2	Chemikalien und Gebrauchsmaterialien.....	108

4.1.3	Radiochemikalien	109
4.1.4	Mikroorganismen.....	109
4.1.4.1	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	109
4.1.4.2	Cyanobakterien	110
4.1.5	Synthetische Oligonukleotide.....	110
4.1.6	Plasmide.....	112
4.1.7	Antikörper.....	113
4.1.8	Enzyme	114
4.1.9	Molekulargewichtsmarker und Fertiggele.....	115
4.1.10	Kommerzielle Kits.....	115
4.1.11	Chromatografie	116
4.1.12	Sonstige Materialien	116
4.1.13	Medien, Puffer und Lösungen	117
4.2	Methoden.....	117
4.2.1	Mikrobiologische und physiologische Methoden.....	117
4.2.1.1	Sterilisation	117
4.2.1.2	Kultivierung von <i>E. coli</i>	117
4.2.1.3	Kultivierung von <i>Synechocystis</i>	118
4.2.1.4	Herstellung von Dauerkulturen.....	119
4.2.1.4.1	<i>E. coli</i>	119
4.2.1.4.2	<i>Synechocystis</i>	120
4.2.1.5	Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen	120
4.2.1.5.1	<i>E. coli</i>	120
4.2.1.5.2	<i>Synechocystis</i>	120
4.2.1.6	Bestimmung der Verdopplungszeit von <i>Synechocystis</i>	121
4.2.1.7	Absorptionsspektren ganzer Zellen von <i>Synechocystis</i>	121
4.2.1.8	Bestimmung des Phycocyanin/Chlorophyll a-Verhältnisses nach Myers ..	122
4.2.1.9	Chlorophyllbestimmung nach Houmard and de Marsac	122
4.2.1.10	Lichtmikroskopie	122
4.2.1.11	Präparation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> –Zellen nach Inoue <i>et al.</i>	123
4.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	123
4.2.2.1	Isolation genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i>	123
4.2.2.2	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	124
4.2.2.3	DNA-Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Mullis <i>et al.</i>	125
4.2.2.4	Reinigung von PCR-Produkten.....	126
4.2.2.5	Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion..	126
4.2.2.6	Bestimmung der DNA-Konzentration und –Reinheit.....	126

4.2.2.6.1	Berechnung der Chromosomen-Kopienzahl nach Griesse <i>et al.</i> [169][169][169].....	127
4.2.2.7	DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen	128
4.2.2.8	Ligation von DNA-Molekülen.....	128
4.2.2.9	Transformation von <i>E. coli</i> nach Hanahan.....	128
4.2.2.10	DNA-Sequenzierung.....	129
4.2.2.11	Konstruktion der Plasmide zur heterologen Expression GST-fusionierter Kai-Proteine	129
4.2.2.12	Konstruktion des Plasmids pCOLD-kaiC1	129
4.2.2.13	Konstruktion des Plasmids pTYB2-kaiC1	130
4.2.2.14	Konstruktion des Plasmids pCOLA-kaiC1 und pACYC-kaiC1	130
4.2.2.15	Ortsgerichtete Mutagenese von pGEX-kaiC3 zur Expression von KaiC3-AA und KaiC3-DE	130
4.2.3	Biochemische Methoden	131
4.2.3.1	Zellernte	131
4.2.3.1.1	<i>E. coli</i>	131
4.2.3.1.2	<i>Synechocystis</i>	131
4.2.3.2	Aufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen.....	131
4.2.3.2.1	Aufschluss durch alkalische Lyse.....	131
4.2.3.2.2	Aufschluss mittels Kavitation.....	131
4.2.3.3	Aufschluss von <i>Synechocystis</i> -Zellen.....	132
4.2.3.4	Fraktionierung von löslichen und membranständigen Proteinen.....	132
4.2.3.5	Heterologe Expression von Proteinen in <i>E.coli</i>	133
4.2.3.6	Reinigung GST-fusionierter Proteine mittels Glutathion- Affinitätschromatografie.....	133
4.2.3.7	Reinigung von Proteinen durch Anionenaustauschchromatografie.....	134
4.2.3.8	Proteinbestimmung	135
4.2.3.8.1	Konzentration von Proteinen	135
4.2.3.8.1.1	DOC/TCA-Fällung von Proteinen nach Bensadoun und Weinstein [308].....	135
4.2.3.8.1.2	TCA-Fällung von Proteinen aus ganzen Zellen.....	135
4.2.3.8.2	Proteinbestimmung nach Lowry	136
4.2.3.8.3	Proteinbestimmung nach Bradford	136
4.2.3.9	Elektrophoretische Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen	136
4.2.3.9.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli	136
4.2.3.9.2	Tricin-SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow.....	138
4.2.3.10	Native Polyacrylamidgelelektrophorese	138
4.2.3.11	Coomassiefärbung von Proteinen	139
4.2.3.12	Immuno-Blot-Analyse	139
4.2.3.12.1	Entfernen gebundener Antikörper (<i>Stripping</i>).....	140

4.2.3.12.2 Quantifizierung der Kai-Proteinmenge.....	141
4.2.3.12.2.1 Relative Quantifizierung	141
4.2.3.12.2.2 Absolute Quantifizierung	141
4.2.3.12.2.3 Berechnung der Amplitude potenzieller Proteinoszillationen	142
4.2.3.13 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	142
4.2.3.13.1 Fixierung, Dehydrierung und Polymerisierung von <i>Synechocystis</i> -Zellen	142
4.2.3.13.2 Präparation von Zelldünnschnitten auf Pioloform-beschichteten Nickel- Netzträgern.....	143
4.2.3.13.3 Immuno-Gold-Labeling	144
4.2.3.13.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen.....	144
4.2.3.13.5 Klassifizierung von cytosolischen und membranständigen Proteinen.....	145
4.2.3.14 Generierung von Antikörpern	145
4.2.3.15 Studien zur <i>in vitro</i> Aktivität der Kai-Proteine.....	146
4.2.3.15.1 Darstellung der Phosphorylierungsformen des KaiC	146
4.2.3.15.1.1 Quantifizierung der KaiC ₇₉₄₂ -Phosphorylierung.....	147
4.2.3.15.2 Kai ₇₉₄₂ -Funktionalitätstest.....	147
4.2.3.15.3 Dephosphorylierung von Proteinen mit Lambda-Protein-Phosphatase	147
4.2.3.15.4 Bestimmung der Kinase-Aktivität	148
4.2.3.15.5 Bestimmung der ATPase-Aktivität.....	148
4.2.3.15.6 Bestimmung der ATP-Synthase-Aktivität	149
4.2.4 Sonstiges	149
4.2.4.1 Sequenzanalysen	149
4.2.4.1.1 BLAST-Analysen	149
4.2.4.1.2 Multiple Alignments	150
4.2.4.2 Statistische Analysen	150
4.2.4.2.1 Zweistichproben t-Test	150
4.2.4.2.2 Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA).....	150
4.2.4.3 Diagramme.....	150
5. Literatur	151
Abkürzungsverzeichnis.....	167
Danksagung.....	173
Publikationsliste	176
Selbstständigkeitserklärung	178
Lebenslauf.....	180

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1. Charakteristika circadianer Rhythmen, veranschaulicht am Beispiel cyanobakterieller Genexpressionszyklen.....	2
Abbildung 1-2. <i>In vivo</i> Verhalten der <i>kai</i> -Genprodukte unter verschiedenen Lichtbedingungen.	7
Abbildung 1-3. Vereinfachte Darstellung des PTO.	9
Abbildung 1-4. Gerichtete Phosphorylierung und Dephosphorylierung von KaiC.	10
Abbildung 1-5. Der PTO ist eingebettet in den <i>Input</i> und <i>Output</i>	17
Abbildung 1-6. Multiple <i>kai</i> -Gene in <i>Synechocystis</i>	24
Abbildung 2-1. Zeitaufgelöste Analyse der temperaturabhängigen KaiC ₇₉₄₂ -Phosphorylierung und Komplexbildung.	28
Abbildung 2-2. Vergleich der KaiC ₇₉₄₂ -KaiB ₇₉₄₂ -Komplexbildung und KaiC ₇₉₄₂ -Phosphorylierung nach kurzer Inkubation bei 30 °C und langer Inkubation bei 4 °C.	29
Abbildung 2-3. Kontrollanalyse zur <i>in vitro</i> Aktivität des KaiC ₇₉₄₂ nach langer Inkubation bei 4 °C. .	31
Abbildung 2-4. Alignment der Aminosäuresequenzen von KaiC1, KaiC2 und KaiC3 im Vergleich zu den Sequenzen der gut charakterisierten Homologe aus <i>Synechococcus</i> und <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1.	33
Abbildung 2-5. Alignment der Sequenzen von KaiB1, KaiB2 und KaiB3 mit Sequenzen ausgewählter bakterieller KaiB-Proteine, die bereits biochemisch charakterisiert wurden.	37
Abbildung 2-6. Untersuchung der Autophosphorylierung von KaiC ₇₉₄₂ in Anwesenheit von KaiA ₆₈₀₃ und KaiB1.	40
Abbildung 2-7. Analyse der KaiC ₇₉₄₂ -KaiB-Komplexbildung durch native PAGE	41
Abbildung 2-8. Analyse der Phosphatinkorporation in KaiC1.....	42
Abbildung 2-9. Untersuchung der Phosphorylierung von KaiC3.	43
Abbildung 2-10. Zuordnung der Phosphorylierungsformen von KaiC3.	45

Abbildung 2-11. Analyse der Bildung [α - 32 P]ATPs durch Dünnschichtchromatografie.....	46
Abbildung 2-12. Bestimmung freigesetzten Phosphats.....	48
Abbildung 2-13. Zeitliche Beschreibung physiologischer Parameter unter diurnalen und circadianen Bedingungen.....	52
Abbildung 2-14. Analyse der Funktionalität der Kai-gerichteten Antikörper.	54
Abbildung 2-15. Exemplarische Westernblot-Analysen zur relativen Quantifizierung der Kai-Proteine in LDL.	56
Abbildung 2-16. Relative Quantifizierung der Kai-Proteinmengen in LDL.	58
Abbildung 2-17. Exemplarische Westernblot-Studien zur Analyse der Abundanz der KaiC-Proteine im Cytosol und der Membranfraktion.	59
Abbildung 2-18. Analyse der Stärke der Membranassoziation bei photoautotrophem und mixotrophem Wachstum	63
Abbildung 2-19. TEM-Aufnahmen nach Immuno-Gold- <i>Labeling</i> zur Lokalisation von KaiA ₆₈₀₃ und KaiC3 bei photoautotrophem Wachstum.....	66
Abbildung 2-20. TEM-Aufnahmen nach Immuno-Gold- <i>Labeling</i> zur Analyse der Verteilung von KaiA ₆₈₀₃ und KaiC3 bei mixotrophem Wachstum.....	68
Abbildung 2-21. Relative Verteilung der Goldpartikel nach Immuno-Gold- <i>Labeling</i> mit α -KaiA- und α -KaiC3-Serum.	70
Abbildung 2-22. TEM-Aufnahmen nach Immuno-Gold- <i>Labeling</i> zur Lokalisation von KaiC1.....	72
Abbildung 2-23. Abundanz von KaiA ₆₈₀₃ und KaiC3 bei photoautotrophem und mixotrophem Wachstum in LD.	74
Abbildung 2-24. Untersuchungen zur Phosphorylierung von KaiC1 und KaiC3 in der Zelle.....	76
Abbildung 3-1. Rekonstruktion des KaiC-KaiB-Komplexes A. Sechs KaiB-Monomere binden an der Oberseite des CII-Rings.	83
Abbildung 3-2. <i>In vivo</i> Verhalten der <i>Synechocystis kaiA</i> - und <i>kaiC</i> -Genprodukte bei langsamem, photoautotrophem Wachstum.	96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1. Physiologische Parameter der <i>Synechocystis</i> -Zellen, die für Kai-Lokalisationsstudien verwendet wurden	61
Tabelle 4-1. Liste der verwendeten Geräte	106
Tabelle 4-2. Lieferanten von Lösungsmitteln, Feinchemikalien und Gebrauchslösungen	108
Tabelle 4-3. Verwendete <i>E. coli</i> Stämme	109
Tabelle 4-4. <i>Synechocystis</i> -Mutanten	110
Tabelle 4-5. Verwendete Synthetische Oligonukleotide	111
Tabelle 4-6. Liste der verwendete Plasmide	112
Tabelle 4-7. Liste der genutzten Antikörper	113
Tabelle 4-8. Enzyme und Reaktionskits	114
Tabelle 4-9. Molekulargewichtsmarker und Fertiggele	115
Tabelle 4-10. Liste der genutzten kommerziellen Kits	115
Tabelle 4-11. Materialien für die Chromatografie	116
Tabelle 4-12. Liste der sonstigen in dieser Arbeit verwendeten Materialien	116

1. Einleitung

1.1 Circadiane Rhythmen

Für die meisten Lebewesen bringt die Erdrotation durch die daraus resultierenden rhythmischen Umgebungsbedingungen eine zeitliche Tagesstruktur mit sich [1]. Sie sind z. B. dem täglichen Wechsel von Licht- und Dunkelheit sowie Temperaturveränderungen ausgesetzt. Viele Organismen haben ihr Verhalten, die Physiologie und metabolische Prozesse an diese Tag-Nacht-Zyklen angepasst [2]. Das Auftreten biologischer Prozesse zu einer bestimmten Tageszeit kann als reine Reaktion auf ein Umgebungssignal erfolgen. Vertreter aller Domänen des Lebens [2,3] haben zudem innere Zeitmesssysteme entwickelt, um die umgebenden Zyklen vorherzusehen und ihre biologischen Prozesse dementsprechend vorausschauend zu steuern. Diese von innen getriebene zeitliche Koordination durch eine **circadiane Uhr** (lat. *circa dies* für ‚ungefähr‘ ‚Tag‘ [4]), bietet unter rhythmischen Umgebungsbedingungen einen kompetitiven Fitnessvorteil [5-8]. Zur Definition eines circadianen Oszillators wurden drei Kriterien aufgestellt (z. B. zusammengefasst in Referenzen 1,4,8-11): Charakteristisch ist demnach **(1.)** die autarke Oszillation mit einer Periodenlänge von ca. (aber meist nicht genau [1]) 24 Stunden, die in Abwesenheit exogener Zyklen - z. B. bei konstanten Lichtverhältnissen - weiterbesteht (*Freilauf*). Zudem ist der circadiane Oszillator **(2.)** gekennzeichnet durch die Fähigkeit zum *Entrainment*, d. h. zur Synchronisation des endogenen Oszillators mit externen rhythmischen Stimuli (*Zeitgeber*). Dadurch wird die Periode des inneren Oszillators, deren Länge im Freilauf charakteristisch für individuelle Organismen ist, auf exakt 24 Stunden und damit die lokale Zeit umgestellt [1,8]. Als Zeitgeber können z. B. Licht- und Temperaturzyklen dienen, wobei die Lichtsignale den Temperaturrhythmen meist übergeordnet sind [12]. Einzelne Pulse der Stimuli können den Oszillator phasenabhängig zurücksetzen (Phasenverschiebung, Abbildung 1-1 [9,11]). Solange die Temperatur jedoch konstant bleibt und innerhalb des physiologischen Bereichs des Organismus liegt, wird die Periodenlänge der endogenen Oszillation nicht signifikant von der Umgebungstemperatur beeinflusst. Es erfolgt dadurch eine für die circadiane Rhythmik **(3.)** charakteristische *Kompensation* der Temperaturabhängigkeit biochemischer Reaktionsgeschwindigkeiten [1,4,8-11]. Wichtige Begrifflichkeiten zur Beschreibung circadianer (und diurnaler) Rhythmen, die in dieser Arbeit verwendet werden, sind in Abbildung 1 veranschaulicht. Zudem soll ihre Definition in Anlehnung an die Referenzen 10-13 hier einmal grundlegend wiedergegeben werden:

- ☞ Die durch externe Stimuli oder einen circadianen Oszillator getriebenen Rhythmen stellen den zyklischen **Output** dar.
- ☞ Die **Periode** ist die Zeit, die für einen Zyklus benötigt wird (gemessen z. B. als Abstand von Maximum zu Maximum).
- ☞ Die **Amplitude** beschreibt die Auslenkung der Schwingung, also den Abstand von der Mittellinie bis zum Maximum oder Minimum.
- ☞ Die **Phase** gibt die Position der Kurve in Relation zu einem Bezugspunkt an.
- ☞ Das *Entrainment* durch 12h:12h Licht-Dunkelzyklen bzw. das Wachstum unter diesen Bedingungen wird in dieser Arbeit als **LD** bezeichnet.
- ☞ Mit **LL** ist das Wachstum bei kontinuierlicher Belichtung nach vorherigem *Entrainment* durch LD gemeint.
- ☞ **DD** bezeichnet analog das Wachstum in kontinuierlicher Dunkelheit nach vorheriger Synchronisation durch LD.
- ☞ In LD kann nicht unterschieden werden zwischen endogenen Oszillationen, die durch Zeitgeber an die lokale Zeit angepasst sind und 24-stündigen Rhythmen, die durch externe Signale gesteuert werden. Daher wird in dieser Arbeit der Begriff **diurnal** für jeglichen mit ca. 24-stündiger Periode oszillierenden **Output** verwendet, der unter LD zu beobachten ist. Die manchmal übliche Unterscheidung zwischen diurnal (tags aktiv) und nocturnal (nachts aktiv) wird dabei nicht angewendet!
- ☞ Als **circadian** werden die (temperaturkompensierten) 24-stündigen Oszillationen, die in LL oder DD fortbestehen, bezeichnet.
- ☞ Bei Wachstum in LD beschreibt der Begriff **ZT** (für engl. *zeitgeber time*) die seit dem Anschalten des Lichts (**ZT0**) verstrichene Zeit.
- ☞ **CT** (für engl. *circadian time*) gibt die Zeit nach der Überführung in kontinuierliche Bedingungen an. In LL bezeichnet **CT0** den Zeitpunkt des Lichtanschaltens nach der Synchronisierung, in DD den Zeitpunkt des Lichtausschaltens.
- ☞ Die **subjektive Nacht** gibt die Zeitspanne in LL an, die mit der Dunkelphase während des *Entrainments* korreliert.
- ☞ Der **subjektive Tag** ist die Zeitspanne in DD, die den Lichtphasen bei der vorherigen Synchronisierung entspricht.

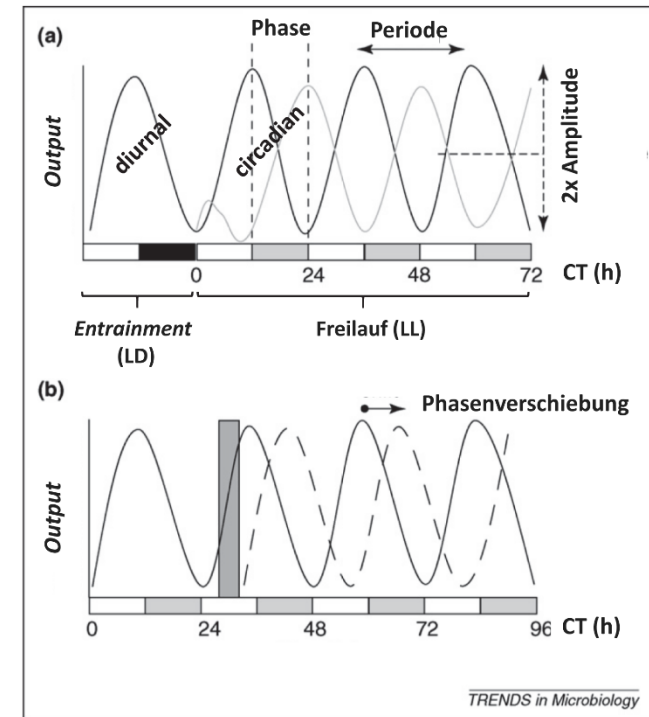


Abbildung 1-1. Charakteristika circadianer Rhythmen, veranschaulicht am Beispiel cyanobakterieller Genexpressionszyklen. **A.** Bei Wachstum in LD ist ein diurnaler *Output* in Form 24-stündiger Oszillationen zu beobachten. Dabei lässt sich zunächst nicht zwischen endogenen Oszillationen und Rhythmen unterscheiden, die als direkte Antwort auf die exogenen Zyklen generiert werden. Die circadianen Rhythmen werden in LD mit den Umgebungszyklen synchronisiert und oszillieren nach Überführung in LL mit ca. 24-stündiger Periode weiter (dunkelgraue Kurve). Zudem gibt es Rhythmen, die erst im Freilauf zu oszillieren beginnen (hellgraue Kurve). **B.** Die Oszillationen können phasenabhängig zurückgesetzt werden. Wird eine Kultur einem einzelnen mehrstündigen Dunkelpuls (dunkelgrauer vertikaler Balken) am subjektiven Tag ausgesetzt, wird die Phase der Oszillationen (gestrichelte Linie) im Vergleich zu den Oszillationen einer Kontrollkultur (durchgehende Linie) verschoben. Erfolgt der Dunkelpuls in der subjektiven Nacht, hat dies nur minimale Auswirkungen (nicht gezeigt). Weiße und schwarze Boxen repräsentieren Tag bzw. Nacht, graue Boxen die subjektive Nacht in LL. Abbildung aus Mackey und Golden [13], modifiziert.

1.2 Circadiane Rhythmen in Prokaryoten – Erste Entdeckungen

Lange Zeit galt das Dogma, Organismen mit einer Generationszeit von weniger als 24 Stunden bedürften keiner circadianen Regulation [9,14]. Aufgrund der häufig unter einem Tag liegenden Verdopplungszeit sowie der Annahme, Prokaryoten seien mangels Zellkompartimentierung viel zu simpel, wurde ihnen der Besitz einer circadianen Uhr sowie die Generierung 24-stündiger Oszillationen abgesprochen [9,11,15-18]. Mittlerweile weiß man jedoch, dass Cyanobakterien ebenfalls eine circadiane Uhr besitzen, die ihnen einen reproduktiven Fitnessvorteil bietet [5,6,19]. In verschiedenen Vertretern wurde eine Vielzahl circadianer Rhythmen beschrieben. So oszillieren z. B. die Genexpression [20-25], Chromosomenkondensation [24,26,27], Zellteilung [28-33], Aminosäureaufnahme [34], Photosynthese [32,35,36], Stickstofffixierung [32,37-39], Respiration [32], der Zellzyklus [40] und auch die Bildung von Speicherstoffen [32,41]. Bemerkenswerterweise werden die circadianen Rhythmen dabei selbst nicht von der Zellteilung beeinflusst und haben auch bei einer Verdopplungszeit von weniger als 24 Stunden Bestand [30,31,42].

Der Grundstein zur Entdeckung der prokaryotischen circadianen Rhythmen wurde vor ca. 30 Jahren gelegt: Es wurde demonstriert, dass die eigentlich inkompatiblen Prozesse der sauerstoffproduzierenden Photosynthese und sauerstoffsensitiven Stickstofffixierung aufgrund einer zeitlichen Trennung in ein und derselben cyanobakteriellen Zelle koexistieren können [1,43]. Viele unizelluläre und filamentöse (nicht zur Zelldifferenzierung befähigte) diazotrophe Cyanobakterien betreiben Photosynthese am Tag und Stickstofffixierung in der Nacht [44]. Mitte der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden erste Berichte veröffentlicht, die - zumindest im Nachhinein betrachtet - eine endogene Kontrolle der 24-stündigen Zyklen nahelegten [1,45]. Eine schöne Zusammenfassung über die entscheidenden Publikationen ist im Übersichtsartikel von Golden *et al.* [18] dargestellt. Hervorzuheben sind intensive Untersuchungen in *Cyanothece* sp. PCC 8801 (früher *Synechococcus* sp. RF-1 oder *Cyanothece* sp. RF-1), die demonstrierten, dass die Stickstofffixierung der Kontrolle einer circadianen Uhr unterliegen muss, da die 24-stündigen Zyklen auch in LL fortbestehen, temperaturkompensiert sind und *entrained* werden können [32,37-39]. Weitere eindeutige Belege für eine circadiane Rhythmik in Cyanobakterien lieferten z. B. Sweeney und Borgese, die temperaturkompensierte 24-stündige Zellteilungsrythmen in *Synechococcus* sp. WH 7803

nachwiesen [33]. Der zugrundeliegende Mechanismus konnte in den analysierten Stämmen jedoch nicht untersucht werden, weil Methoden zur genetischen Manipulation fehlten.

1.3 Die circadiane Uhr von *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Der unizelluläre, obligat photoautotrophe Süßwasserstamm *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (früher *Anacystis nidulans* R2, von hier an mit *Synechococcus* abgekürzt) wurde bereits 1976 das erste Mal von G. Grigorieva und S. Shestakov erfolgreich transformiert [46]. Zudem wurden frühzeitig weitere Methoden zur einfachen genetischen Manipulation etabliert (eine ausführliche Übersicht wird in Referenz 46 gegeben). Aufgrund dieser molekularbiologischen Möglichkeiten entstand die Idee, den Mechanismus der cyanobakteriellen circadianen Uhr in *Synechococcus* zu untersuchen [18,47-49]. Da *Synechococcus* aber nicht zur Stickstofffixierung befähigt ist, musste zunächst nach einem anderen leicht zu messenden circadianen Parameter gesucht werden [49]. Takao Kondo, Masahiro Ishiura, Susan Golden, und Carl Hirschie Johnson gelang hier der Durchbruch: Es wurde ein Reporterstamm generiert, in dem der *psbA*-Promotor mit den Luciferase-Genen *luxAB* aus *Vibrio harveyi* fusioniert und ins Genom integriert wurde. Dadurch konnte nach Zugabe des Luciferase-Substrats Decanal die Promotoraktivität indirekt über Biolumineszenz gemessen werden. In Flüssigkultur zeigte diese eine temperaturkompensierte, 24-stündige Oszillation, die mit externen LD-Zyklen synchronisiert werden konnte [49]. Ein circadianer *Output* war somit gefunden. Anschließend wurde die automatisierte Messung und Auswertung der Biolumineszenz von Einzelkolonien auf Agarplatten etabliert [45,50] und so der Weg zur Analyse der cyanobakteriellen circadianen Rhythmik im „Hochdurchsatz“ ermöglicht. Zum einen wurde durch randomisierte Insertion der *luxAB*-Gene in das *Synechococcus*-Chromosom eine globale circadiane Kontrolle der Genexpression nachgewiesen [51]. Zum anderen konnte durch chemische Mutagenese des Reporterstamms und anschließende Komplementation mit genomischen DNA-Fragmenten nach dem genetischen Ursprung der circadianen Uhr gesucht werden [52,53].

1.3.1 *In vivo* Oszillation der *kai*-Genprodukte

Dies gelang im Labor von Takao Kondo, wo die drei für den circadianen Oszillator kodierenden Gene identifiziert wurden [53]. Alle sind für die circadiane Rhythmik essenziell und liegen aufeinanderfolgend innerhalb eines *Genclusters* [53]. Entsprechend ihrer Reihenfolge im

Cluster sowie in Anlehnung an den japanischen Ausdruck *kaiten*, (japanisch für ‚Zyklus‘) wurden sie *kaiA*, *kaiB* und *kaiC* genannt [53]. In Eukaryoten basieren circadiane Oszillationen meist auf autoregulatorischen Transkriptions-/Translations-Rückkopplungsschleifen (TTFL für engl. *transcriptional translational feedback loops*). Unter anderem deswegen wurde dies zunächst auch für *Synechococcus* angenommen [54]. Später zeigte sich jedoch, dass zwar ein TTFL in die Generierung der robusten circadianen Oszillationen involviert ist, die treibende Kraft aber ein posttranslatiionaler Oszillator (PTO) darstellt, der sich aus den drei Kai-Proteinen zusammensetzt. Bevor auf den Mechanismus dieses PTO eingegangen wird, soll hier zunächst dargestellt werden, dass die *kai*-Genprodukte *in vivo* unter verschiedenen Lichtbedingungen (LD, LL, DD) charakteristische Muster aufweisen (Siehe auch Abbildung 1-2).

Während *kaiB* und *kaiC* dicistronisch transkribiert werden, steht die *kaiA*-Expression unter der Kontrolle eines eigenen Promotors, dessen Aktivität nur ca. ein Drittel der des *kaiBC*-Promotors beträgt [53]. Beide Promotoren sind circadian aktiv [53]. Sowohl in LD als auch in LL kommt es zu einer rhythmischen Akkumulation der *kaiA*- und *kaiBC*-mRNAs mit einem Maximum kurz vor bzw. während der (subjektiven) Dämmerung (ZT/CT 9-12 [21,53,55-58]). In DD oszillieren die mRNA-Mengen dagegen nicht. Die Transkripte werden im Dunkeln innerhalb weniger Stunden degradiert und bleiben auf diesem niedrigen Niveau [58].

Auch die KaiB- und KaiC-Proteine zeigen in LL circadiane Akkumulationsprofile, die über mehr als drei Tage fortbestehen und deren Minima (~CT 4) und Maxima (CT 15-18) übereinstimmen [56-61]. Im Schnitt liegen ca. 10.000 Moleküle KaiC und etwa 20.000 Moleküle KaiB pro Zelle vor [60]. Die Zahl an KaiA-Molekülen pro Zelle beträgt nur einen Bruchteil dessen (~250-500) und zeigt trotz der beschriebenen *kaiA*-Transkriptzyklen keine oder nur eine minimale Oszillation [54,59,60].

Die rhythmische Akkumulation des KaiC-Proteins in LL ist das Resultat von ebenfalls circadian variierenden Synthese- und Degradationsraten [21,57]. Die maximale Synthese erfolgt ca. zwei Stunden nach dem Auftreten der maximalen mRNA-Abundanz, weshalb angenommen wird, dass die Synthese primär vom mRNA-Level abhängt [57]. Vier Stunden später - in der Mitte der subjektiven Nacht - ist das KaiC-Protein am stabilsten. Von der späten subjektiven Nacht bis zum frühen Vormittag hingegen weist es, zeitgleich mit einer sehr geringen Syntheserate, eine deutlich kürzere Halbwertszeit auf [57].

In LD und DD dagegen bleiben die Gesamtmengen aller drei Kai-Proteine nahezu konstant [54,58]. Für KaiC wurde zwar zunächst eine Oszillation mit äußerst geringer Amplitude in DD berichtet, eine spätere Studie konnte dies jedoch nicht bestätigen [58,59]. Das konstant hohe KaiC-Niveau in der Dunkelheit ist darauf zurückzuführen, dass sowohl die Synthese als auch die Degradation inhibiert sind [58]. In der Lichtphase des LD-Zyklus finden ebenfalls weder Netto-Synthese noch Degradation statt, weil sich beide Prozesse gegenseitig kompensieren [54,58].

Kitayama und Kollegen zeigten 2003, dass auch die Lokalisation von KaiB und KaiC in LL oszilliert [60]: Während KaiA ausschließlich im Cytosol präsent ist, liegen KaiB und KaiC sowohl cytosolisch als auch membranassoziiert vor. Der membranassoziierte Anteil an KaiB (50-80 %) ist dabei deutlich größer als der des KaiC-Proteins (10-30 %), sodass sich trotz der insgesamt höheren KaiB-Molekülzahl pro Zelle ein äquimolares Verhältnis von KaiB zu KaiC im Cytosol ergibt. Der membranassoziierte Teil des KaiB-Proteins oszilliert ungefähr synchron mit der gesamten KaiB-Menge und somit auch synchron mit dem KaiC-Protein (s.o.). Die Oszillation des cytosolischen KaiB-Proteins ist jedoch phasenverschoben, wodurch das lösliche KaiB erst vier Stunden nach dem löslichen KaiC sein Maximum erreicht [60]. Kürzlich wurde demonstriert, dass KaiC in LD einer zusätzlichen räumlichen Organisation unterliegt: Nachts konzentriert es sich in der Nähe eines der beiden Zellpole, tagsüber liegt es hingegen gleichmäßig verteilt in der Zelle vor [62]. Diese Oszillation ist in abgeschwächter Form auch in LL zu beobachten [62]. Zur Lokalisation in DD scheinen bislang keine Untersuchungen vorzuliegen.

Die robusteste Protein-Rhythmik stellt jedoch die Phosphorylierung und Dephosphorylierung des KaiC-Proteins dar [54]. Sowohl in LL, DD als auch LD wechselt KaiC mit ca. 24-stündiger Periode seinen Zustand zwischen einer dephosphorylierten (ZT/CT 0-4) und vollständig phosphorylierten Form (ZT/CT 12-16) [54,56,58]. Die Oszillation besteht in DD mindestens 56 Stunden fort und ist temperaturkompensiert [58]. Der Zyklus basiert auf den jeweils oszillierenden, intrinsischen Kinase- und Dephosphorylierungs-Aktivitäten des KaiC-Proteins, die durch die rhythmische Interaktion mit KaiA und KaiB moduliert werden (siehe Absatz 1.3.2.2). Zudem wird die Phosphorylierungsrhythmik dadurch unterstützt, dass sich die Stabilitäten der beiden Phosphorylierungsstufen von KaiC gegenläufig circadian verhalten: In der Phosphorylierungsphase wird dephosphoryliertes KaiC schneller degradiert, während in der Dephosphorylierungsphase das phosphorylierte Protein instabiler ist [57]. Die Proteinsynthese

scheint hingegen keinen Einfluss auf den Phosphorylierungszyklus zu haben [57]. Interessanterweise liegt das membranassoziiertes KaiC in LL primär dephosphoryliert vor [60].

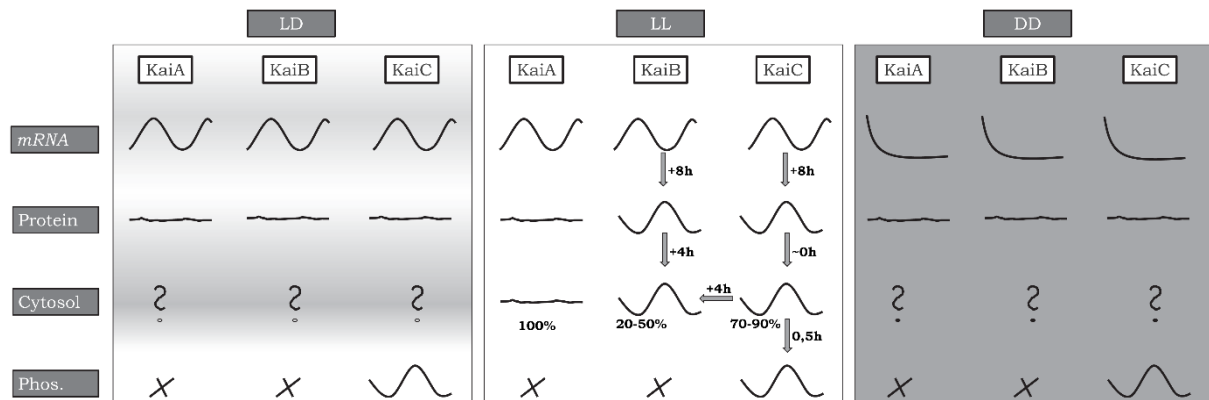


Abbildung 1-2. In vivo Verhalten der *kai*-Genprodukte unter verschiedenen Lichtbedingungen. Während alle Transkripte in LD und LL oszillieren, werden sie in DD schnell degradiert. In LL oszilliert die Proteinmenge von KaiB und KaiC. Das KaiA-Niveau bleibt unter allen Bedingungen konstant. KaiB und KaiC liegen in LD und DD konstant vor. Der cytosolische Anteil von KaiB und KaiC oszilliert in LL. Die Prozentzahlen geben den Anteil cytosolischen Proteins wieder. KaiC lokalisiert in LD nachts in der Nähe des Zellpols. Es liegen aber keine Informationen zum Anteil und zur zeitlichen Akkumulation cytosolischen KaiC in LD vor. Unter allen Bedingungen oszilliert der Phosphorylierungszustand von KaiC. In LL ist die zeitliche Verzögerung zwischen den jeweiligen Maxima durch graue Pfeile markiert. Da die Literaturangaben hinsichtlich der exakten Zeitpunkte nicht immer einheitlich sind, wurden für die Verzögerung die Daten von Kitayama *et al.* [60] und Imai *et al.* [57] berücksichtigt. Weitere Informationen und Referenzen befinden sich im Haupttext.

Bereits 1998 wurde von Carl Hirschie Johnson und Kollegen darauf hingewiesen, dass in vielen phototrophen Organismen mit circadianer Uhr der Kernoszillator zwar unter allen Lichtbedingungen oszilliert, in DD aber kein rhythmischer *Output* beobachtet werden könne [59]. Dass nahezu alle hier beschriebenen Oszillationen der *kai*-Genprodukte im Dunkeln verschwinden, weist demnach bereits darauf hin, dass diese nicht den Kernoszillator bilden, wohingegen der KaiC-Phosphorylierung besondere Bedeutung zukommt.

1.3.2 Der posttranslationale Oszillator

Das Jahr 2005 markiert einen Wendepunkt im Verständnis der cyanobakteriellen circadianen Uhr. Tomita und Kollegen zeigten, dass die oben beschriebene *in vivo* Phosphorylierungsrhythmik des KaiC-Proteins unabhängig von der Transkription und Translation erfolgt [58]. Zudem gelang der Gruppe um Takao Kondo ein wegweisendes Experiment: Durch die Inkubation von KaiA, KaiB und KaiC in Anwesenheit von ATP konnten die temperaturkompensierten Phosphorylierungszyklen auch *in vitro* erzeugt werden [63]. Später wurde demonstriert, dass auch diese *in vitro* Oszillationen äußerst robust sind. Selbst bei einer Aufnahme über 10 Tage blieb die Amplitude ungedämpft [64]. Durch diese und weitere

Experimente wurde eindeutig belegt, dass die Proteinoszillationen autonom von den drei Proteinen generiert werden und die circadiane Rhythmik in Cyanobakterien somit durch einen PTO statt des in Eukaryoten weithin vorherrschenden Transkriptions-Translations-Oszillators gesteuert wird [z.B.58,65,66-68].

1.3.2.1 Das KaiC-Protein

KaiC repräsentiert die zentrale Komponente dieses Kernoszillators. Das 58 kDa große Protein gehört zur RecA/DnaB-Superfamilie. Es besteht aus zwei replizierten Domänen mit 41,6 % Ähnlichkeit zueinander, die in derselben Orientierung aufeinanderfolgend angeordnet und durch eine 16 Aminosäuren lange *Linkersequenz* verbunden sind [69-72]. Vom N-Terminus aus gesehen, werden sie als CI-Domäne bzw. CII-Domäne oder auch CI- bzw. CII-Hälfte bezeichnet [69]. Beide beherbergen für ATP-bindende Proteine typische Motive, namentlich ein Walker A-Motiv (auch *p-Loop*), ein unvollständiges Walker B-Motiv sowie 2 Glutamatreste, deren Carboxylgruppen als katalytische Gruppen fungieren [69]. KaiC-Monomere assemblieren ATP-abhängig zu einem Hexamer [73]. Dabei nehmen die CI- und CII-Domänen eine sehr ähnliche Faltung an und formen zwei aufeinanderliegende (CI- bzw. CII-) Ringe mit einer zentralen Pore, wodurch insgesamt die Struktur eines „Doppel-Donuts“ gebildet wird [70,73-76]. In beiden Ringen wird an den sechs Kontaktflächen zwischen zwei aneinandergrenzenden Monomerhälften jeweils ein ATP-Molekül gebunden, sodass insgesamt 12 Moleküle ATP in das KaiC-Hexamer integriert werden [75,76].

Das KaiC-Hexamer weist mehrere intrinsische Enzymaktivitäten auf: Im CII-Ring sind eine Kinase- [77], eine ATP-Synthase- [78,79] sowie eine ATPase- [80,81] und im CI-Ring ebenfalls eine ATPase-Aktivität [80,81] lokalisiert. Die Aktivitäten der beiden Domänen sind miteinander verknüpft [82,83] und verhalten sich infolge dynamischer Interaktionen von KaiC mit KaiA und KaiB circadian [84]. Es werden 24-stündige Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungszyklen [63,85,86] sowie eine zyklische Netto-ATPase-Aktivität [81] generiert (siehe auch Abbildung 1-3). Im Folgenden werden die Mechanismen beschrieben, die den zyklischen Aktivitäten zugrunde liegen. Dabei wird teilweise auch auf Informationen zurückgegriffen, die durch die Analyse der Kai-Proteine aus *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 gewonnen wurden, ohne dass dies gesondert gekennzeichnet ist.

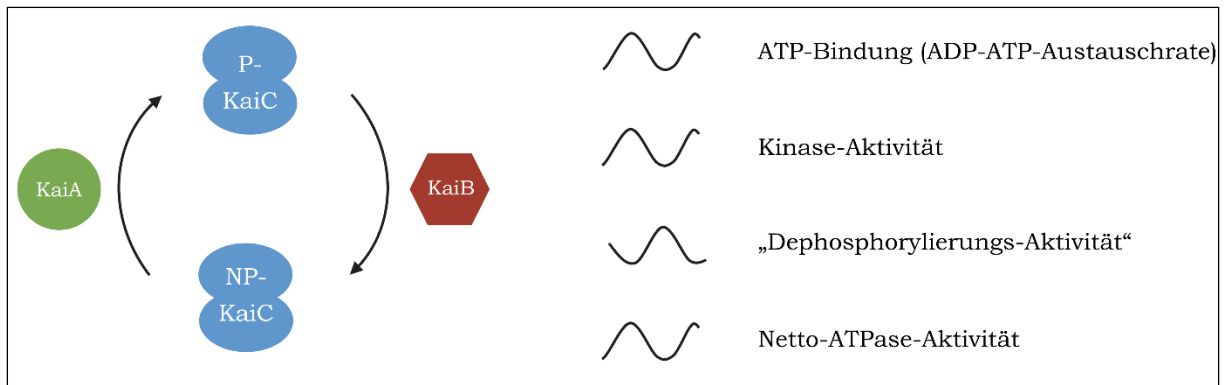


Abbildung 1-3. Vereinfachte Darstellung des PTO. KaiC oszilliert mit 24-stündiger Periode zwischen einem phosphorylierten (P-KaiC) und dephosphorylierten Zustand (NP-KaiC). KaiA stimuliert die Phosphorylierung. KaiB fördert (indirekt) die Dephosphorylierung. Die rhythmische Phosphorylierung kommt durch eine zyklische Aufnahme von ATP, rhythmische Kinase-Aktivität und zyklische Aktivitäten, die zur Dephosphorylierung führen, zustande. Zudem zeigt KaiC eine rhythmische Netto-ATPase-Aktivität.

1.3.2.2 Circadiane Phosphorylierung und Dephosphorylierung

Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung erfolgt an den Resten Threonin 432 (T432) und Serin 431 (S431) in den CII-Domänen der zum Hexamer assemblierten KaiC-Monomere [76,87]. Dabei wird die Phosphatgruppe bei beiden Reaktionen aus kinetischen Gründen immer zuerst auf T432 übertragen und auch zuerst von diesem entfernt. Dadurch ergibt sich ein gerichteter Zyklus von nicht-phosphoryliertem KaiC ($\text{KaiC}^{\text{S/T}}$) über Threonin-phosphoryliertes KaiC ($\text{KaiC}^{\text{S/pT}}$) zu doppelt phosphoryliertem KaiC ($\text{KaiC}^{\text{pS/pT}}$) und über Serin-phosphoryliertes KaiC ($\text{KaiC}^{\text{pS/T}}$) zurück zu $\text{KaiC}^{\text{S/T}}$ [76,85,86,88]. Für die gerichtete Dephosphorylierung ist die transiente Phosphorylierung einer zusätzlichen Phosphorylierungsstelle (T426) essenziell [76,79,88,89].

Phosphorylierung und Dephosphorylierung können als Hin- und Rückreaktion betrachtet werden, da die zugrundeliegenden Enzymaktivitäten dasselbe aktive Zentrum nutzen [78,79]. Bei der Phosphorylierung eines Monomers wird die γ -Phosphatgruppe eines am *P-Loop* einer CII-Domäne gebundenen ATP-Moleküls auf die Hydroxygruppe von T432 bzw. S431 der benachbarten CII-Domäne übertragen (Kinaseaktivität, [70,75,76,90]). Es verbleibt ein ADP am entsprechenden *P-Loop* [91]. Bei der Dephosphorylierung eines Monomers wird das kovalent an T432 bzw. S431 gebundene Phosphat wieder zurück auf das ADP im *P-Loop* der Nachbardomäne transferiert (ATP-Synthaseaktivität) und das entstehende ATP anschließend hydrolysiert (ATPase-Aktivität) [78,79]. Liegt KaiC alleine vor, dominiert bei physiologischen Temperaturen die Dephosphorylierung [92], wohingegen infolge der Interaktion mit KaiA die

Zu Beginn des in Abbildung 1-4 dargestellten Phosphorylierungszyklus liegt KaiC dephosphoryliert vor. An den *P-Loops* im CII-Ring sind ADP-Moleküle gebunden und deren Austauschrate gegen exogenes ATP ist gering [91]. Folglich steht kaum ATP als Donor für die Phosphorylierung zur Verfügung [91]. Zudem wäre aufgrund der lokalen Struktur der CII-Domänen eine Übertragung der γ -Phosphatgruppen potenziell gebundener ATP-Moleküle auf T432 und S431 in den jeweiligen Nachbardomänen nicht möglich, weil deren Hydroxylgruppen zu weit entfernt sind [70,90]. Dieser Zustand wird durch die Konformation der *A-Loops* bedingt [95]. Diese elf Aminosäuren langen, C-terminalen Segmente (Reste 487-497) werden in Abwesenheit von KaiA jeweils vorwiegend in einer geborgenen Konformation stabilisiert, die die sterische Inhibierung der Phosphorylierung nach sich zieht [70,95,96].

Durch die wiederholte schwache Assoziation eines KaiA-Dimers in der Nähe tentakelartiger Segmente, die aus dem CII-Ring ragen, wird die Phosphorylierung eingeleitet (**1.** in Abbildung 1-4, [56,84,87,97-102]). Zum einen wird die Austauschrate von ADP gegen externes ATP an den *P-Loops* erhöht, wodurch ATP als Donor für die Autophosphorylierung zur Verfügung steht (**1.** in Abbildung 1-4, [91]). Zum anderen werden Bindungen, die die *A-Loops* jeweils in ihrer geborgenen Konformation halten, gelöst und diese stattdessen in einer exponierten Konformation stabilisiert [70,95,96]. Die damit einhergehenden lokalen Strukturveränderungen haben zur Folge, dass die gebundenen ATP-Moleküle und die entsprechenden Phosphorylierungsstellen jeweils für die Übertragung der Phosphatgruppen ausreichend nah beieinander liegen [70,95]. Dabei handelt es sich um einen allosterischen Prozess. Die Entfaltung eines *A-Loops* erleichtert die entsprechenden lokalen Strukturveränderungen und somit die Stimulation der Phosphorylierung in den übrigen Domänen [70,90]. Pro Monomer wird T432 phosphoryliert (**2.** in Abbildung 1-4), das verbleibende ADP am *P-Loop* der Nachbardomäne gegen exogenes ATP ausgetauscht (**3.** in Abbildung 1-4) und anschließend S431 phosphoryliert (**4.** in Abbildung 1-4, [91]). Nach acht Stunden liegt das KaiC-Hexamer vollständig phosphoryliert vor [94].

Infolge der Phosphatübertragung auf S431 werden die Aktivitäten im CII-Ring von der Phosphorylierung zur Dephosphorylierung umgeschaltet [85]. Erneut spielen Strukturveränderungen eine zentrale Rolle: Im Vergleich zu KaiC^{S/pT} ist der CII-Ring in KaiC^{pS/pT} weniger flexibel, was die geborgene Konformation der *A-Loops* begünstigt und somit die Phosphorylierung inhibiert [96,103]. Nishiwaki-Ohkawa und Mitarbeiter postulierten, dass in dieser starrereren CII-Konformation zudem der Austausch von gebundenem ADP gegen

externes ATP inhibiert wird [91]. Darüber hinaus seien die gebundenen ADP-Moleküle jeweils so zu den phosphorylierten Resten der Nachbardomäne positioniert, dass diese als Akzeptoren für die Phosphatübertragung im Rahmen der Dephosphorylierung zur Verfügung stehen [91]. Infolgedessen wird T432 spontan dephosphoryliert (**5.-6.** in Abbildung 1-4, [85,86]). Der CII-Ring im entstehenden KaiC^{pS/T} wird noch starrer, was zur stabilen Bindung von KaiB führt und das Gleichgewicht weiter in Richtung Dephosphorylierung verschiebt [98,104]. Verschiedene Studien belegen, dass KaiB auch an KaiC^{pS/pT} bindet [86,99,103]. Da die Dephosphorylierung von T432 unabhängig von KaiB erfolgt [85], wurde die Bindung an KaiC^{pS/pT} in Abbildung 1-4 jedoch zum besseren Verständnis der zyklischen Abläufe ausgespart. Nach Bindung von KaiB wird der Phosphatrest von S431 ebenfalls auf ADP übertragen (**7.** in Abbildung 1-4) und das entstehende ATP hydrolysiert (**8.** in Abbildung 1-4, [78,79,91]). Dadurch liegt das KaiC-Hexamer wieder unphosphoryliert mit gebundenem ADP vor, sodass der Zyklus von vorne beginnen kann [78,79,91].

1.3.2.3 Circadiane (Netto-)ATPase-Aktivität

Die ATP-Hydrolyse im CII-Ring im Rahmen der zweistufigen Dephosphorylierung kann als eine Art Energiekonservierung betrachtet werden, durch die der Kernoszillator nicht auf eine Energieversorgung durch den Metabolismus angewiesen ist [12,72,105]. Pro Tag und KaiC-Monomer werden nur ca. 0,3-0,4 Moleküle Phosphat für die Übertragung auf T432 und S431 benötigt [81]. Dennoch zeigt das gesamte KaiC-Protein eine Netto-ATP-Hydrolyse von ca. 15 Molekülen pro Monomer und Tag [81]. Dies geht vor allem auf die ATPase-Aktivität im CI-Ring zurück, die 70 % der Aktivität des Gesamtproteins ausmacht [80,81]. Auch hier findet die ATP-Hydrolyse an den Grenzflächen der assemblierten CI-Hälften statt [72]. Im Grundzustand wird an den *P-Loops* gebundenes ATP mit konstanter Rate hydrolysiert [80,81,106] und das entstehende ADP ebenfalls konstant gegen externes ATP ausgetauscht [91]. Diese konstante ATPase-Aktivität stellt den Taktgeber des molekularen Oszillators dar [81,91,106]. Terauchi und Kollegen zeigten, dass die Rate der ATP-Hydrolyse direkt mit der Frequenz der circadianen *in vivo* Oszillationen korreliert: Je höher diese intrinsische konstante Rate ist, desto niedriger ist die Periodenlänge der Oszillationen [81]. Die ATP-Hydrolyse in CI wird dabei weder durch KaiA noch durch metabolische Signale (siehe auch Kapitel 1.3.5) beeinflusst [105,107], ist aber mit den Aktivitäten im CII-Ring gekoppelt [82,83]. Der Phosphorylierungszustand des CII-Rings wird anhand struktureller Veränderungen vom CI-Ring sensiert [72,81,83,104]. Hier kommen die leichte Kontraktion und Ausdehnung des CII-Ringes während eines Zyklus [83],

eine relative Drehung der Ringe zueinander [72] sowie der sich verändernde Abstand der beiden aufeinanderliegenden Ringe [104] in Frage. Darum wird die ATP-Hydrolyse indirekt in Anwesenheit von KaiA stimuliert und durch KaiB inhibiert. Im Gegensatz zur Kinaseaktivität erfolgt die Inhibierung durch KaiB unabhängig von KaiA [81]. Aufgrund der Verknüpfung der beiden Domänen ergibt sich in Anwesenheit von KaiA und KaiB eine circadiane Netto-ATPase-Aktivität, die zwischen einer Hydrolyserate von ca. 5-28 Molekülen ATP pro KaiC-Monomer und Tag oszilliert und ihr Maximum etwa vier Stunden vor der maximalen Phosphorylierung zeigt [81,105]. Durch die Analyse von Proteinvarianten, die die entsprechenden Zustände durch Aminosäure-Austausche imitieren, wurde gezeigt, dass phosphoryliertes KaiC eine niedrigere ATPase-Aktivität aufweist als nicht-phosphoryliertes KaiC [81]. Dabei nimmt die ATP-Hydrolyserate während der Phosphorylierung von KaiC^{S/T} über KaiC^{S/pT} zu KaiC^{pS/T} ab, verbleibt nach der Dephosphorylierung von T432 in KaiC^{pS/T} vergleichbar gering und nimmt dann nach der weiteren Dephosphorylierung in KaiC^{S/T} wieder den höchsten Wert ein [83].

Die ATPase-Aktivität ist für ein typisches Charakteristikum circadianer Oszillatoren verantwortlich: Sie vermittelt unabhängig vom Phosphorylierungszustand und unabhängig von KaiA und KaiB eine Temperaturkompensierung [80,81]. Es wurde postuliert, dass durch die Integration der temperaturkompensierten ATPase-Aktivität mit den CII-Aktivitäten erreicht wird, dass an sich temperaturempfindliche Prozesse wie z. B. die Komplexbildung mit KaiA und KaiB ebenfalls weniger temperaturabhängig sind [83].

1.3.2.4 Intrazelluläre Synchronisierung der KaiC-Aktivitäten

Die bemerkenswert robusten Phosphorylierungszyklen mit hoher Amplitude werden durch eine intrazelluläre Synchronisierung der KaiC-Aktivitäten stabilisiert. Die Kinase- und Dephosphorylierungsaktivitäten **innerhalb eines** KaiC-Hexamers werden durch Interaktionen zwischen den Monomeren synchronisiert: Monomere, die sich in der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung befinden, stimulieren die entsprechenden Aktivitäten in den anderen Monomeren desselben Hexamers [90]. Zudem erfolgt eine Synchronisierung der Dephosphorylierung **zwischen verschiedenen** KaiC-Hexamern durch die Sequestrierung von KaiA-Molekülen (Abbildung 1-4 [99,101,108-111]). Hier nimmt die KaiC-KaiB-Interaktion eine Schlüsselfunktion ein: Der Komplex aus KaiC^{pS/T} und KaiB bindet KaiA-Dimere an einer neu geschaffenen Bindestelle [85,86,99,101,108]. Da die Affinität von KaiA zu dieser Bindestelle höher ist und mehrere KaiA-Dimere sequestriert werden, wird die zuvor

beschriebene schwache Assoziation am C-Terminus desselben sowie weiterer KaiC-Hexamere verhindert. Diese treten darum ebenfalls in die Dephosphorylierung ein, sequestrieren weitere KaiA-Moleküle und innerhalb von einer Stunde ist die KaiA-vermittelte Stimulation der Phosphorylierung vollständig inhibiert [86,101,109-111]. Um sicherzustellen, dass auch bei schwankenden Proteinkonzentrationen in allen Phasen des Phosphorylierungszyklus die richtige KaiA-Menge zur Verfügung steht, wird KaiA zudem konstant an einer dritten Bindestelle von KaiC sequestriert [84,101]. Darüber hinaus findet in der frühen Dephosphorylierungsphase ein schneller Austausch von Monomeren zwischen den KaiC-Hexameren statt, was ebenfalls zur Synchronisierung der Dephosphorylierung beiträgt [64,84,108,112-115]. Der Austausch scheint in Anwesenheit von KaiA und KaiB überwiegend nach KaiB-Bindung zwischen KaiC^{pS/T}- und KaiC^{S/T}-Hexameren stattzufinden, weil die KaiC-Monomere hier weniger stark miteinander interagieren als in KaiC^{S/pT} und KaiC^{pS/pT} (Abbildung 1-4, [79,83,113]). Darüber hinaus unterliegt der ATPase-Aktivität eine Rolle in der Synchronisierung der Oszillationen. Zum einen ist die CI-ATPase-Aktivität für die KaiB-Bindung erforderlich und somit für die KaiA-Sequestrierung und darauf basierende Synchronisierung der Dephosphorylierung essenziell [105,116]. Zum anderen fungiert sie *in vivo* als Signal, das den Takt der Zellteilung kontrolliert und vermutlich dazu dient die Präzision der Uhr zu bewahren [28,31].

1.3.3 Der PTO ist eingebettet in einen TTFL

Die innere Uhr von *Synechococcus* ist auch in Zellpopulationen durch äußerste Präzision und Robustheit gekennzeichnet. Dies schlägt sich in der Langlebigkeit der Genexpressionsrhythmen unter circadianen Bedingungen nieder. So konnten z. B. für die *psbA*- und *kaiBC*-Promotoren circadiane Aktivitäten von mehr als zwei Wochen nachgewiesen werden [9,117]. Die bemerkenswerte Robustheit der *in vivo* Oszillationen wird nicht durch eine Kommunikation der Zellen untereinander erreicht [118,119]. Stattdessen werden die intrazellulären Rhythmen dadurch stabilisiert, dass der PTO in einen TTFL eingebettet ist, der die *kaiBC*-Promotoraktivität circadian kontrolliert und dadurch zu den in Kapitel 1.3.1 beschriebenen Oszillationen der *kaiBC*-Genprodukte beiträgt [54,65,120]. Hierbei ist insbesondere die Oszillation der Stöchiometrie von KaiC und KaiA unter LL relevant [66]. Circadiane Oszillationen können zwar in Abwesenheit des TTFL bestehen [z.B. 58,65,68,121], verhalten sich in einer Zellpopulation mit der Zeit aber zunehmend asynchron, was vor allem bei schnell wachsenden Zellen - mit einer Verdopplungszeit von weniger als 24 Stunden - zum

Tragen kommt [65,120]. Durch die Rückkopplung mit der Transkription und Translation hingegen wird der Kernoszillator unempfindlich gegenüber den mannigfaltigen Schwankungen, denen er in der lebenden Zelle ausgesetzt ist (z. B. Verdünnungen infolge der Zellteilung, wechselnden Wachstums-, Transkriptions-, Translations- und Degradationsraten sowie Temperaturveränderungen und Schwankungen im metabolischen Status, [12,65,72]). Qin und Kollegen postulierten, der PTO stelle den essenziellen Kernoszillator, der TTFL hingegen nur einen untergeordneten, vom PTO abhängigen Oszillator dar [54]. Dem entgegen besagen theoretische Berechnungen, dass unter bestimmten Bedingungen, wie z. B. niedrigen Wachstumsraten, circadiane Oszillationen auch allein durch den TTFL erzeugt werden können [120], was vereinzelt durch experimentelle Studien bestätigt werden konnte [122,123]. Diese teils widersprüchlichen Resultate veranschaulichen, dass die Bedeutung und das Zusammenspiel von PTO und TTFL noch nicht abschließend aufgeklärt sind. Interessanterweise ist die Vernetzung von TTFL und PTO aber auch in anderen Organismen weit verbreitet [120,124]. Im Jahr 2011 wurden in DNA-freien roten Blutzellen sowie *Ostreococcus*-Zellen circadiane Zyklen der Oxidation und Reduktion von Peroxiredoxin gefunden, die nicht der *de novo* Transkription bedürfen [125,126]. Dadurch verdichten sich die Hinweise, dass posttranslationale Rhythmen auch in Eukaryoten eine bedeutendere Rolle spielen, als ihnen in den letzten Jahrzehnten zugeordnet wurde [3,12,125-128].

Trotz teilweise widersprüchlicher Ergebnisse, setzt sich derzeit folgendes Bild zusammen wie der PTO die *kaiBC*-Expression in *Synechococcus* beeinflusst (siehe auch Abbildung 1-4): Abhängig vom Phosphorylierungszustand und dem Zusammenspiel mit den anderen Kai-Proteinen übt KaiC eine positive oder negative Rückkopplung auf seinen eigenen Promotor aus. KaiC^{S/T} [53,56,129] und der Komplex aus KaiB und KaiC^{pS/T} [130] unterdrücken die Transkription von *kaiBC*, während KaiC^{S/pT} [129] und KaiC^{pS/pT} [129,130] den Promotor aktivieren. Zudem wurde eine positive Korrelation zwischen der ATPase-Aktivität von KaiC und der *kaiBC*-Transkription postuliert [28]. Auch KaiA hat im Zusammenspiel mit KaiC einen indirekten positiven Einfluss auf die *kaiBC*-Expression [53,56,131]. Die Rückkopplung des PTO mit der *kaiBC*-Expression wird durch die Regulation von Transkriptionsfaktoren erzeugt (siehe auch Abbildung 1-5): RpaA (für engl. *regulator of phycobilisome association/associated-A*, [132,133]) stellt dabei den Hauptregulator dar [134]. Er fungiert als klassischer *Response*-Regulator eines Zweikomponentensystems, der durch die Sensor-Histidinkinase SasA (für engl. *Synechococcus adaptive sensor*, [55]) phosphoryliert und somit aktiviert wird [130,132,135]. Interessanterweise kann er aber durch die Phosphatase-Aktivität

einer weiteren Histidinkinase (CikA, für engl. *circadian input kinase A*, [136]) dephosphoryliert und somit inaktiviert werden, wodurch insgesamt eine zeitlich koordinierte antagonistische Regulation erzielt wird [130]: SasA wird um die (subjektive) Dämmerung herum [129,135] durch die Interaktion seiner Sensordomäne [55] mit KaiC^{pS/pT} [129,130] und KaiC^{S/pT} [129] stimuliert. Phosphoryliertes RpaA aktiviert daraufhin die *kaiBC*-Expression durch direkte Bindung an den *kaiBC*-Promotor [134] und verdrängt zudem den Transkriptionsfaktor RpaB (für engl. *regulator of phycobilisome association/associated B*, [132,133]), der dort zuvor als Repressor fungierte [129,137]. CikA hingegen wird durch den Komplex aus KaiC^{pS/T} und KaiB in der Nacht aktiviert [130,135]. Durch die daraus resultierende Dephosphorylierung von RpaA verliert dieser seine Affinität zum *kaiBC*-Promotor [134] und kann zudem dem inhibitorischen Einfluss von RpaB nicht mehr entgegenwirken [129,137]. Da RpaB darüber hinaus vermutlich durch nicht-phosphoryliertes KaiC als Repressor aktiviert wird, wird die *kaiBC*-Expression insgesamt effektiv reprimiert [129]. Unabhängig davon wird RpaA auch durch LabA (für engl. *low-amplitude and bright*, [138]) reprimiert, welches vermutlich durch phosphoryliertes KaiC aktiviert wird und somit ebenfalls in die negative Rückkopplung in der Nacht involviert ist [135,138]. Kürzlich wurde mit dem 7 kDa kleinen Protein Crm (für engl. *circadian rhythmicity modulator*, [139]) ein weiterer Faktor entdeckt, der die RpaA-Aktivität beeinflusst [139]). Darüber hinaus scheint LalA (für engl. *labA-like A* [140]), ein Paralog des negativen Regulators LabA, durch einen bislang nicht geklärten Mechanismus in die Rückkopplung des PTO mit der *kaiBC*-Expression involviert zu sein [140].

1.3.4 Der PTO steuert den globalen *Output*

Neben der Kontrolle der *kaiBC*-Promotoraktivität steuert der PTO die globale circadiane Genoszillation als einen *Output* der circadianen Uhr. Abhängig von der Methode und Auswertung wurde bestimmt, dass 30 % [21], 64 % [27] bzw. bis nahezu 100 % [51] aller Gene circadian exprimiert werden. Entgegen der früheren Annahme, eine Überexpression von KaiC reprimiere die Expression nahezu aller circadianen Gene [121,138], wurde kürzlich demonstriert, dass stattdessen die Gene unterdrückt werden, deren Transkripte zur Dämmerung maximal akkumulieren [141]. Die Gene, deren maximale Expression am Morgen erfolgt, werden durch eine Überexpression von KaiC aktiviert [21,141]. Die verstärkte Expression von KaiA hat den gegenteiligen Effekt [141]. Zur Erzeugung des circadianen *Outputs* ist aber erneut die Phosphorylierung von KaiC von Bedeutung. Hier kommen die im Zusammenhang mit der

kaiBC-Expression beschriebenen Signalwege, die in der Modulation der RpaA-Phosphorylierung resultieren, zum Tragen (Abbildung 1-4).

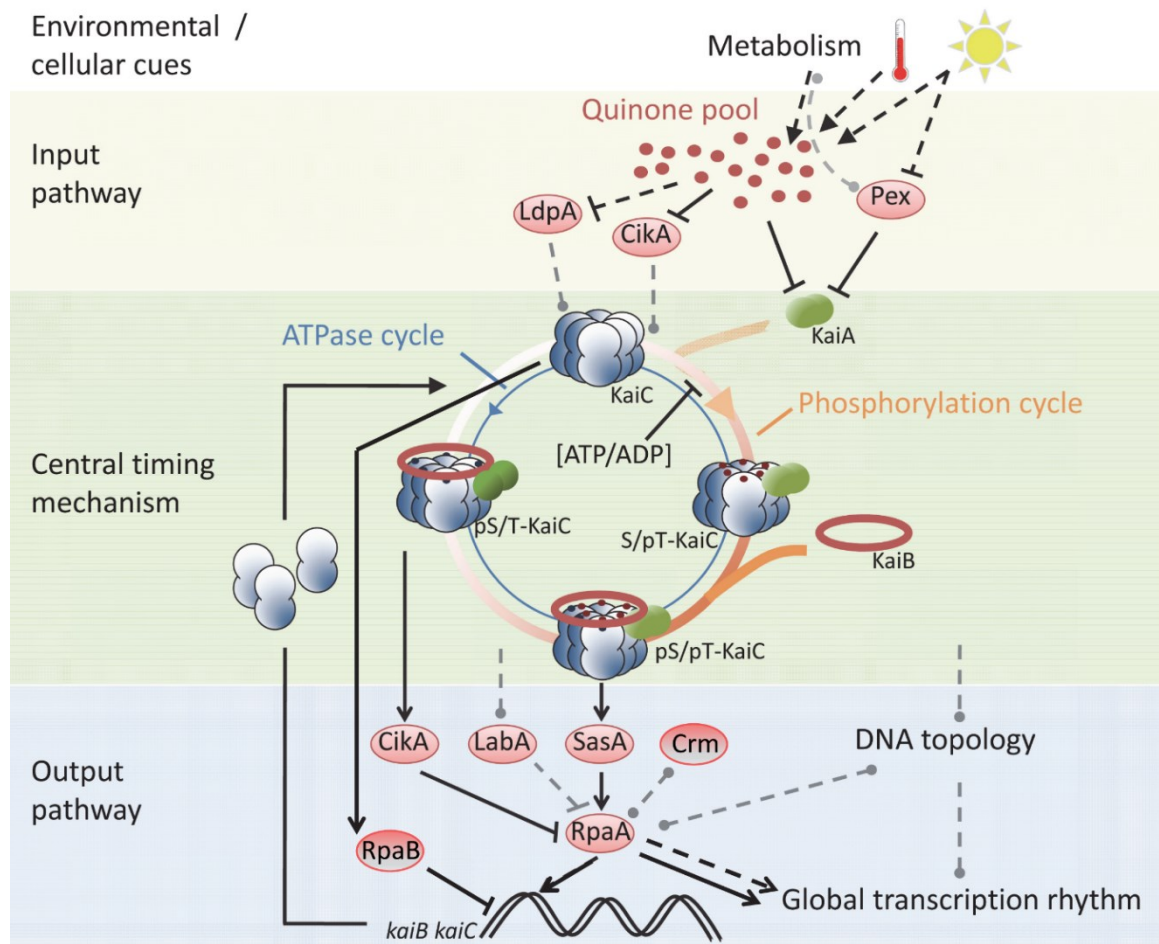


Abbildung 1-5. Der PTO ist eingebettet in den Input und Output. Durch die rhythmische Interaktion mit KaiA (grün) und KaiB (rot) werden ein gerichteter Phosphorylierungszyklus (*Phosphorylation cycle*, orange) und eine circadiane ATPase-Aktivität (*ATPase cycle*, blau) von KaiC generiert (*Central timing mechanism* = PTO, siehe auch Abbildung 1-4). Im Gegensatz zu Abbildung 1-4 sind hier die Bindung von KaiB und die daraus resultierende Sequestrierung von KaiA bereits an KaiC^{pS/pT} dargestellt. Die Aktivitäten werden durch metabolische Veränderungen, die ein Resultat der umgebenden Zyklen sind (*Environmental cues*, *cellular cues*) mit diesen synchronisiert (*Input pathway*). Die Phosphorylierung wird u. a. aufgrund der Oxidation von Plastochinon (*Quinone pool*, rot) verzögert, da dieses KaiA sowie die Inputfaktoren CikA und LdpA inhibiert. Zudem wird die *kaiA*-Promotoraktivität im Dunkeln durch Pex unterdrückt, was vermutlich ebenfalls durch den metabolischen Status reguliert wird. Abhängig von der Phosphorylierungsstufe aktiviert KaiC durch direkte oder indirekte Interaktion die Outputfaktoren SasA, CikA, LabA und RpaB (*Output pathway*). Aktiviertes RpaB fungiert als Repressor der *kaiBC*-Expression. Die restlichen Faktoren modulieren die Phosphorylierung des Hauptregulators RpaA. Zudem wird die RpaA-Aktivität durch Crm beeinflusst. Phosphoryliertes RpaA bindet an den *kaiBC*- sowie viele weitere Promotoren und aktiviert diese. Dephosphoryliertes RpaA dissoziiert von den Promotoren, was einer negativen Regulation gleichkommt. Zudem ist RpaA vermutlich in die Regulation der DNA-Topologie involviert. Insgesamt werden so eine rhythmische *kaiBC*-Akkumulation sowie globale Genexpressionszyklen generiert, deren Phase an die Länge der diurnalen Umgebungszyklen angepasst ist. Durchgehende Linien symbolisieren eine direkte, unterbrochene Linien eine indirekte Interaktion bzw. Regulation. Pfeile repräsentieren eine Aktivierung, stumpfe Enden eine Reprimierung. Punkte symbolisieren eine Einflussnahme, deren Art und/oder Mechanismus noch nicht geklärt ist. Abbildung aus Axmann *et al.* [142], modifiziert. Die Originalabbildung wurde freundlicherweise von Dr. Stefanie Hertel zur Verfügung gestellt. Weitere Referenzen und Informationen sind dem Text zu entnehmen.

Durch Promotor-Bindung aktiviert phosphoryliertes, nicht aber dephosphoryliertes RpaA die Expression von fast 200 Protein-kodierenden sowie ca. 40 für kleine RNAs (sRNAs) kodierenden Genen [134]. Da sich unter den regulierten Genprodukten Faktoren befinden, die die Genexpression und Translation selbst maßgeblich beeinflussen, dient RpaA als Hauptregulator des *Outputs*, der letztendlich deutlich mehr als die direkt angesteuerten Gene kontrolliert [134,143]. Ggf. gibt es aber auch einen von RpaA unabhängigen *Output* [131,132]. Daneben erfolgt eine noch globalere Regulation der Genexpression durch die Veränderung der DNA-Struktur. Das gesamte *Synechococcus* Chromosom wird circadian so moduliert, dass es am Tag kondensiert und in der (subjektiven) Nacht relaxiert vorliegt [26]. Dies geht mit einer Oszillation des superhelikalen Status der DNA einher [27,144]. Interessanterweise gibt es Hinweise darauf, dass auch diese Regulation letztendlich mit der Modulation der RpaA-Phosphorylierung durch den PTO zusammenhängen könnte [134].

Als weiteren *Output* kontrolliert die circadiane Uhr die Zellteilung, indem sie diese während der subjektiven Dämmerung inhibiert [28,29,31]. Auch hier ist das Zweikomponentensystem aus SasA und RpaA involviert, da phosphoryliertes RpaA die Bildung des für die Zellteilung erforderlichen FtsZ-Rings verhindert [28]. Es wurde postuliert, dass in diesem Fall für die Aktivierung von SasA primär die ATPase-Aktivität von KaiC entscheidend ist [28].

1.3.5 *Entrainment* des Oszillators

Zu den Charakteristika, die eine echte circadiane Uhr definieren, zählt die Fähigkeit den zentralen Oszillator mit den umgebenden Zyklen zu synchronisieren (siehe Abschnitt 1.1). Dieses *Entrainment* kann in *Synechococcus* durch Licht- und Temperaturzyklen erfolgen [113,145]. Die Sensitivität gegenüber den Zeitgebern ist dabei phasenabhängig [61,107,136]. Interessanterweise scheinen keine Photorezeptoren in das *Entrainment* des PTO involviert zu sein [146]. Stattdessen sensiert der PTO metabolische Veränderungen, die aus der photosynthetischen Aktivität resultieren und somit eine Konsequenz der umgebenden Lichtzyklen sind [12,147].

Unter anderem fungiert das Verhältnis von ATP zu ADP als Signal zur Justierung des PTO: Im Licht ist das ATP/ADP-Verhältnis in der Zelle als Resultat der Photophosphorylierung von ADP hoch, wohingegen es sich bei einem Dunkelpuls innerhalb von zwei bis drei Stunden graduell auf die Hälfte reduziert [107]. Diese Verringerung der ATP/ADP-Ratio kann den PTO am subjektiven Tag phasenabhängig zurücksetzen, da der nur tagsüber schnell ablaufende

Austausch von ADP gegen ATP am CII-Ring blockiert wird und somit kein ATP als Substrat für die Phosphorylierung zur Verfügung steht [91,107]. Ähnlich dem Phänomen der Temperaturkompensierung wird aber eine große Spanne des ATP/ADP-Verhältnisses toleriert, sofern dieses konstant bleibt [12,107].

Neben der Verringerung des ATP/ADP-Verhältnisses löst ein Dunkelpuls die schnelle Oxidation des intrazellulären Plastochinon-*Pools* aus, weil die Reduktion durch das Photosystem II ausbleibt [12,147]. Experimente mit chemischen Plastochinon-Analoga implizieren, dass oxidiertes Plastochinon direkt an KaiA bindet, was zur Aggregation des Proteins führt und ggf. dessen Bindung an KaiC kompetitiv inhibiert [148,149]. Dadurch wird der stimulatorische Effekt von KaiA auf die Kinase-Aktivität von KaiC blockiert und der PTO somit infolge der durch Dunkelheit herbeigeführten Veränderung des Redox-Zustands phasenabhängig zurückgesetzt [147-149]. Der Redox-Zustand wird auch durch die Histidinkinase CikA und das Eisen-Schwefelprotein LdpA (für engl. *light dependent period*, [150]) sensiert, die direkt oder indirekt mit dem Kai-Komplex interagieren und die Synchronisierung des Oszillators mit der lokalen Zeit unterstützen [136,151,152]. CikA, das ebenfalls direkt an Plastochinon-Analoga binden kann [151], ist für das Zurücksetzen des PTOs durch Dunkelpulse essenziell [136]. Es inhibiert die ATPase-Aktivität [28] und verzögert die Phosphorylierung von KaiC [151]. Vermutlich generiert es die Phasenverschiebung kooperativ mit KaiA [147]. Dabei interagiert es mit vier weiteren in den *Input* involvierten Faktoren [153]. LdpA ist in die Regulation der Periodenlänge involviert und passt den Oszillator kontinuierlich an sich ändernde Lichtintensitäten an [150]. Sowohl CikA als auch LdpA werden durch oxidierte Chinone destabilisiert und somit durch den Redoxzustand der Zelle reguliert [151,152]. Wichtig ist, dass vermutlich alle Inputsignale durch direkte oder indirekte Interaktion vom CII-Ring des KaiC-Hexamers sensiert werden [72,105], während die CI-ATPase-Aktivität und auch die Phosphorylierung in CII, für den *Output* relevant sind [28,72,105].

Zusätzlich zu diesen Mechanismen der posttranslationalen Regulation scheint das *Entrainment* auch aus der Einbettung des PTO in den TTFL zu resultieren [66]. Die Überexpression von KaiC kann den Oszillator zurücksetzen [53,59]. Relevant ist hier die Neusynthese von unphosphoryliertem KaiC, weil dieses infolge des Monomeraustauschs den mittleren Phosphorylierungszustand der KaiC-Hexamere herabsetzen kann [64] und die Phosphorylierungszyklen durch die Stöchiometrie von KaiA und KaiC beeinflusst werden ([154,155], siehe auch Kapitel 1.3.2.4 und 1.3.3). Über die Regulation des Verhältnisses von

KaiA zu KaiC nimmt auch ein Transkriptionsfaktor Einfluss auf das *Entrainement*: Pex (für engl. *period extender*, [156]) wird im Dunkeln exprimiert und reprimiert daraufhin die *kaiA*-Promotoraktivität, wodurch es die Phosphorylierung von KaiC verzögert [21,132,157,158]. Vermutlich ist die *pex*-Expression ebenfalls an den metabolischen Status der Zelle gekoppelt [159].

1.4 Cyanobakterielle Vielfalt – Auch in der zeitlichen Koordination?

Cyanobakterien besiedeln die unterschiedlichsten Habitate und sind in vielerlei Hinsicht heterogen [160,161]. Sie repräsentieren eines der am weitesten verbreiteten und diversesten Phylen der Bakterien [162]. Aufgrund ihrer Morphologie wurden sie von Rippka und Kollegen in fünf Sektionen unterteilt (I. unizellulär, sich binär teilend, II. unizellulär, sich multipel teilend (Baeocyten bildend), III. filamentös, IV. filamentös und zur Zelldifferenzierung befähigt V. verzweigt filamentös und zur Zelldifferenzierung fähig) [163]. Auch darüber hinaus ist die Formenvielfalt immens: Manche Vertreter bilden Zellaggregate (z. B. *Gloeotheca*, [163]) oder leben in Symbiose (z. B. *Candidatus Atelocyanobacterium thalassa*, früher *Cyanobakterium UCYN-A*, [164]). Durch die große Bandbreite an Licht-absorbierenden Pigmenten reicht das Farbspektrum der Cyanobakterien angesichts des physikalischen Lichtspektrums von blaugrün, über rot, bis hin zu gelb [165]. Die Genomgröße variiert zwischen 1,4 Mbp (*Candidatus Atelocyanobacterium thalassa*) und mehr als 15,8 Mbp (*Mastigocoleus testarum* BC008) mit ca. 1.200 bis 11.000 Protein-kodierenden Genen [166]. Das Chromosom kann einen GC-Gehalt von ca. 30,8 % (*Prochlorococcus marinus* str. MIT 9515) bis 68,7 % (*Cyanobium gracile* PCC 6307) aufweisen [166] und als einzelne Kopie (z. B. in *Synechococcus* sp. WH8101 und *Prochlorococcus marinus* PCC 9511, [40,167]) in wenigen Kopien (z. B. *Synechococcus* und *Synechococcus* sp. WH7803, [29,168,169]) oder stark polyploid (z. B. in *Synechocystis*, [169]) in der Zelle vorliegen.

So vielfältig wie die Cyanobakterien selbst sind auch die Präsenz und Ausprägung des rhythmischen *Outputs*. Allgemein variiert die Zahl und Amplitude der oszillierenden Gene sowie der Zeitpunkt ihrer maximalen Expression. Zum Teil ist der *Output* nur in LD rhythmisch, zum Teil bestehen die Oszillationen auch in LL fort. Dabei können auch innerhalb eines Organismus manche Prozesse circadian reguliert sein und andere nur diurnale Zyklen aufweisen. Um dies zu veranschaulichen, soll hier für einige exemplarische Stämme nur der rhythmische *Output* verglichen werden, der sowohl in LD als auch LL untersucht wurde. Der

Übersicht halber werden auch die bereits erwähnten Rhythmen in *Synechococcus*, zu welchen Information über die Ausprägung in LD **und** LL vorliegen, noch einmal kurz gegenüber gestellt:

Mehr als 95 % [21] aller mRNAs zeigen diurnale Akkumulationsprofile in *Synechococcus*. Ungefähr ein Drittel [21] bis zwei Drittel [27] des Transkriptoms oszilliert in LL. Sogar in DD wurden gedämpfte Oszillationen gefunden [66]. Ebenfalls sowohl in LD als auch LL erfolgen eine rhythmische Kondensation und Relaxion des Chromosoms sowie die Synchronisierung der Zellteilung [26,29-31,143]. Die Aminosäure-Aufnahme (exemplarisch gemessen für Leucin) hingegen geschieht in LD zyklisch, bleibt in LL aber konstant [34,57]. Gleiches gilt für die photosynthetische Aktivität [35].

In *Cyanothece* sp. ATCC 51142 verhalten sich - im Vergleich zu *Synechococcus* - deutlich weniger Transkripte rhythmisch in LD (ca. 30 %, [170]). Es wurden aber ebenfalls circadiane Genexpressionsrhythmen (ca. 10 %, [20]) und eine in LD und LL oszillierende Chromosomenkompaktierung detektiert [24]. Im Gegensatz zu *Synechococcus* ist auch die Photosyntheserate in *Cyanothece* sp. ATCC 51142 circadian [35]. Neben den circadianen Oszillation können hier interessanterweise auch Genexpressions- und Photosynthesezyklen mit zwölfstündiger Periode auftreten (ultradiane Oszillationen), die aber temperatursensitiv sind [171,172]. In dem nahen Verwandten *Cyanothece* sp. PCC 8801 wurde zudem eine zyklische Aminosäure-Aufnahme nachgewiesen, die sich anders als in *Synechococcus*, circadian verhält [34].

Prochlorococcus marinus MED4 hingegen zeigt eine mit *Synechococcus* vergleichbare Zahl diurnal oszillierender Gene (91 % der Protein-kodierenden, ca. 70 % der sRNA-kodierenden Gene, [173]). Exemplarische Analysen in *Prochlorococcus marinus* PCC 9511 deuten jedoch darauf hin, dass in diesem Genus keine circadianen Transkriptsoszillationen vorhanden sind [40]. Damit übereinstimmend ist der Zellzyklus in LD, nicht aber in LL synchronisiert [40].

Für *Crocospaera watsonii* WH 8501 wurde berichtet, dass in LD nahezu die Hälfte aller Transkripte rhythmisch abundant sind [174] und eine exemplarische mRNA in LL weiter oszilliert [24]. Wie groß der Anteil circadian exprimierter Gene hier ist, scheint noch nicht untersucht worden zu sein. Es wurde aber nachgewiesen, dass die Chromosomenkondensation und Photosynthese sowohl in LD als auch LL oszillieren [24,175].

Auch die Zahl, Zusammensetzung und Syntenie der *kai*-Gene variiert in den cyanobakteriellen Gattungen. Abgesehen von dem sehr spezialisierten, „primitiven“ Vertreter *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 scheinen alle Cyanobakterien mindestens ein *kaiC*-Gen zu besitzen [176-178]. In *Prochlorococcus* wurde *kaiA* im Rahmen der Reduktion des Genoms schrittweise deletiert [40,179,180]. Aufgrund biochemischer Analysen wurde postuliert, dass die verbleibenden Komponenten (KaiB und KaiC) eine sehr simple posttranslationale Uhr bilden, die ähnlich einer Sanduhr zwar die seit Tagesbeginn verstrichene Zeit messen kann, jedoch jeden Tag zurückgesetzt werden muss [179]. Das vermutlich nur in Symbiose lebensfähige Cyanobakterium *Candidatus Atelocyanobacterium thalassa*, mit einem noch kleineren Genom, besitzt weder *kaiA* noch *kaiB* [142,164,181]. Demgegenüber gibt es viele Vertreter, die infolge von Genduplikationsereignissen sowie lateralem Gentransfer mehrere *kaiB*- und *kaiC*-Homologe enthalten [182]. Generell scheint aber immer nur ein *kaiA*-Gen vorhanden zu sein [12,182,183]. Für KaiB und KaiC kodierende Gene existieren auch in anderen Eubakterien und Archaeen [12,182,183]. In Bezug auf das Vorhandensein mehrerer *kai*-Homologe ist *Synechocystis* besonders hervorzuheben, da es einen der Stämme mit der höchsten Anzahl an *kai*-Genen repräsentiert.

1.5 *Synechocystis* sp. PCC 6803 - ein Repräsentant mit multiplen *kai*-Genen

Das unizelluläre, nicht-diazotrophe Cyanobakterium *Synechocystis* wurde 1986 von R. Kunisawa aus demselben kalifornischen Süßwasserteich wie auch *Synechococcus* isoliert [163,184] und zählt zu den ersten Organismen, deren Genom vollständig sequenziert wurde [185]. Dieses hat eine Gesamtgröße von 3,95 Mbp und umfasst sieben Plasmide sowie ein zirkuläres Chromosom [166,185,186], welches abhängig vom Laborstamm und den Wachstumsbedingungen in bis zu 218 Kopien in der Zelle vorliegen kann [169,187]. Bislang wurden ca. 3.500 Protein-kodierende Gene [166] und Transkriptionsstartpunkte für ca. 1.300 kleine nicht-kodierende RNAs identifiziert [188]. Schon früh wurden einfache Methoden zur genetischen Manipulation entwickelt [186,187]. Im Gegensatz zu *Synechococcus* ist *Synechocystis* auch zu mixotrophem und licht-aktiviertem heterotrophem Wachstum mit Glucose als Energiequelle fähig [189]. *Synechocystis* dient als Modell zur Untersuchung der cyanobakteriellen Genregulation und ist Hauptuntersuchungsobjekt für die Entwicklung biotechnologischer Applikationen, wurde aber vor allem als bedeutender Modellorganismus in der Photosynthese-Forschung etabliert [186,190].

Durch die Messung gelösten Sauerstoffs wurde belegt, dass die Photosynthese und die damit verbundene Sauerstoffproduktion in *Synechocystis* zeitlich koordiniert wird: Am Tag ist die gebildete Sauerstoffmenge hoch, in der Nacht gering [35]. Die rhythmische Aktivität besteht auch in LL fort, was eine circadiane Regulation impliziert [35]. Frühe Northernblot-Analysen bzw. Biolumineszenzmessungen nach Promotorfusion mit *luxAB* belegten eine circadiane Akkumulation der *dnaK*-mRNA sowie die echt circadiane, temperaturkompensierte Aktivität des *dnaK*-Promotors [191]. Letztere oszillierte bei licht-aktiviertem heterotrophem Wachstum auch in DD und konnte sowohl in LL als DD phasenabhängig zurückgesetzt werden [191,192]. Zur globaleren Suche nach rhythmisch aktiven Promotoren klonierten Aoki und Kollegen eine Bibliothek genomischer DNA-Fragmente vor das *luxAB*-Operon und analysierten die Transformanten über Messung der Biolumineszenz. Die Messungen ließen zunächst vermuten, *Synechocystis* zeige ebenfalls nahezu genomweite circadiane Genoszillationen. In jener Publikation wurde aber bereits eine geringe Ausbeute an Biolumineszenz-zeigenden Transformanten angemerkt [193]. Eine spätere Transkriptomanalyse zeigte dann auch, dass die Zahl der circadian akkumulierenden Transkripte deutlich geringer ist als zunächst angenommen [194]. Abhängig von der zur Auswertung genutzten Methode und den Filterkriterien reicht der Anteil der circadian oszillierenden Gene von unter zwei bis zu maximal neun Prozent [21,194]. Dies entspricht in etwa dem Anteil an Genen, die in Eukaryoten circadian reguliert sind (ca. 5-10 %, [92,141]). Die Amplitude der Oszillationen ist deutlich geringer als die der in *Synechococcus* beobachteten und der Großteil jener Gene, die im Modellorganismus eine circadiane Expression mit besonders hoher Amplitude zeigen, oszillieren nicht signifikant in *Synechocystis* [21,191,193]. Zudem scheinen die circadianen Genoszillationen weniger robust zu sein als in *Synechococcus* [191-193]. Dem ungeachtet zeigt *Synechocystis* einen deutlichen diurnalen Output: In LD akkumulieren ca. 43 % aller Transkripte zyklisch [195]. Zudem erfolgt die Leucinaufnahme diurnal [34].

Im *Synechocystis* Genom finden sich sieben *kai*-Gene [182,185,196] (Abbildung 1-6), von denen fünf nachweislich eine circadiane Promotoraktivität besitzen [194]. Auf dem Hauptstrang des Chromosoms sind drei zu den *Synechococcus* *kai*-Genen orthologe Sequenzen lokalisiert, die ebenfalls in einem *Cluster* angeordnet sind (*kaiAB1C1-Cluster*) [196]. Darüber hinaus findet sich dort isoliert liegend ein zusätzliches *kaiC*-Homolog (*kaiC3*). Auf dem komplementären Strang liegen dicht aufeinander folgend je ein weiteres *kaiC*- und *kaiB*-Homolog (*kaiC2B2-Cluster*) sowie ferner ein drittes, isoliertes *kaiB*-Gen (*kaiB3*). Aufgrund

phylogenetischer Studien wurde geschlussfolgert, dass die drei kodierten KaiB- und KaiC-Proteine divergierte Untergruppen repräsentieren [197].

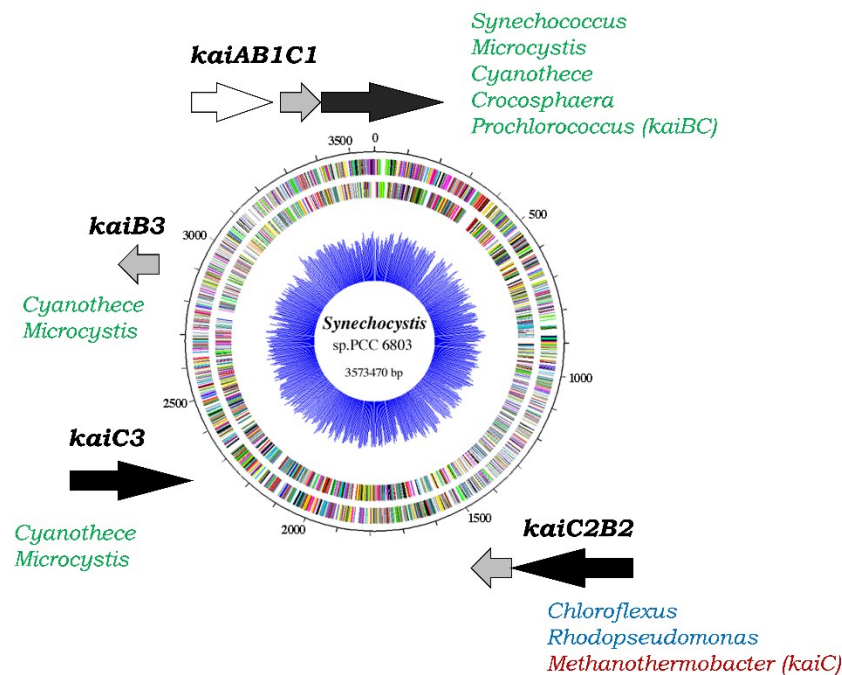


Abbildung 1-6. Multiple *kai*-Gene in *Synechocystis*. Dargestellt sind die Anordnung der *kai*-Gene und ihre ungefähre Lokalisation im Chromosom. Die Leserichtung ist durch die Ausrichtung der Pfeile nach rechts (Hauptstrang) bzw. links (Folgestrang) symbolisiert. Neben den Genen sind exemplarische Gattungen aufgeführt, in deren Genom Proteine mit hoher Ähnlichkeit kodiert sind. Grün: Cyanobakterien, blau: Proteobakterien, rot: Archaeen, weißer Pfeil: *kaiA*, grauer Pfeil: *kaiB*, schwarzer Pfeil: *kaiC*. Die grafische Darstellung der Karte des *Synechocystis*-Chromosoms wurde der Cyanobase [198] entnommen.

1.6 Ziel der Arbeit

Cyanobakterien zeichnen sich durch eine ausgeprägte Heterogenität aus, die sich auch in einer stark variierenden Zahl von *kai*-Genen in den bislang sequenzierten Genomen niederschlägt. Welche Funktionen den zusätzlich kodierten Kai-Homologen zukommen, war zu Beginn dieser Arbeit weitgehend unklar. So lagen auch zur Funktion der insgesamt sieben Kai-Proteine aus *Synechocystis* nahezu keine Informationen vor. Das Vorhandensein eines rhythmischen *Outputs*, der sich z. T. von jenem des intensiv studierten Modellorganismus *Synechococcus* zu unterscheiden scheint, warf die Frage auf, ob und wie die multiplen *kai*-Gene in die zeitliche Koordination involviert sind. Aufgrund unveröffentlichter Analysen von Inaktivierungsmutanten wurde zwar vorgeschlagen, dass die *kaiAB1C1*-Genprodukte einen zu den *Synechococcus*-Proteinen orthologen Oszillator bilden und *kaiB3* sowie *kaiC3* eine Rolle in dessen Feinjustierung spielen [196]. Eine Charakterisierung auf Proteinebene war jedoch nicht vorhanden.

Synechocystis wurde daher als Modell zur Untersuchung einer möglicherweise komplexer aufgebauten Kai-basierten Uhr ausgewählt. Zur weiteren Eingrenzung potenzieller Funktionen sollten Aktivitäten und Wechselwirkungen der multiplen Kai-Proteine zunächst anhand von Sequenzinformationen vorhergesagt werden. Anschließend galt es die Proteine heterolog zu exprimieren und zu reinigen, um ausgewählte Aktivitäten exemplarisch zu beschreiben. Ein besonderer Fokus wurde dabei auf KaiC3 als Vertreter einer divergierten Untergruppe von Kai-Proteinen, welche möglicherweise in die Feinjustierung der zeitlichen Koordination involviert sind, gelegt. Zudem sollte die zeitliche Akkumulation (und Phosphorylierung) der Kai-Proteine unter diurnalen und Freilaufbedingungen untersucht werden, um die für *Synechococcus* beschriebene Bedeutung des TTFL für die Robustheit circadianer Rhythmen in *Synechocystis* zu überprüfen. Darüber hinaus waren Studien zur zellulären Verteilung beabsichtigt, um weitere Regulationsebenen zu beleuchten.

Daneben sollte auch eine Methode etabliert werden, um Untersuchungen zur kontrovers diskutierten Assemblierung von KaiC und KaiB aus *Synechococcus* zu ermöglichen, die nicht auf die Verwendung modifizierter Proteinvarianten angewiesen sind.

2. Ergebnisse

Der Ergebnisteil befasst sich mit Untersuchungen zu den Kai-Proteinen aus *Synechococcus* und *Synechocystis*, die z. T. auch vergleichend erfolgten. Zur eindeutigen Differenzierung werden die *Synechococcus*-Proteine darum als KaiA₇₉₄₂, KaiB₇₉₄₂ und KaiC₇₉₄₂ bezeichnet, während KaiA₆₈₀₃, KaiB1, KaiB2, KaiB3, KaiC1, KaiC2 und KaiC3 deren Homologe aus *Synechocystis* kennzeichnen. Werden KaiA, KaiB und KaiC ohne weitere Spezifikation genannt, handelt es sich um allgemeine Aussagen.

2.1 *In vitro* Untersuchungen zur Phosphorylierung und Komplexbildung des KaiC₇₉₄₂ bei niedrigen Temperaturen

Die Assoziation von KaiB₇₉₄₂ an KaiC₇₉₄₂ nimmt im Verlauf des Phosphorylierungszyklus in *Synechococcus* einen hohen Stellenwert ein, weil sie die Dephosphorylierung durch KaiA-Sequestrierung stabilisiert, die CI-ATPase-Aktivität unterdrückt und ggf. den KaiC₇₉₄₂-Monomeraustausch fördert [64,81,84,99,101,108-111,114,115]. Bislang wurden die meisten Untersuchungen zur KaiC-KaiB- bzw. KaiC-KaiB-KaiA-Komplexbildung mit modifizierten Varianten der KaiC-Proteine aus *Synechococcus* oder *Thermosynechococcus* durchgeführt, in denen Aminosäuren ausgetauscht oder deletiert sind [84-86,99,103,199,200]. Im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Albert J. R. Heck (*Utrecht University* und *Netherland Proteomics Centre*, Utrecht, Niederlande) sollten dagegen Bedingungen etabliert werden, die die Analyse der Komplexbildung mit unveränderten Wildtyp-Proteinen erlauben. In diesem Abschnitt wird mein experimenteller Beitrag dazu beschrieben. Die hier präparierten Proteine wurden von Joost Snijder für weiterführende Experimente zur Stöchiometrie und Topologie des KaiC₇₉₄₂-KaiB₇₉₄₂-Komplexes verwendet. Diese Daten werden in der Diskussion in Abschnitt 3.1 dargestellt.

KaiA₇₉₄₂, KaiB₇₉₄₂ und KaiC₇₉₄₂ wurden, wie in Iwasaki *et al.* [56] bzw. Nishiwaki *et al.* [87] beschrieben, heterolog als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimiert und gereinigt. Eine *Linker*-Sequenz mit einer 3C-Protease-Schnittstelle erlaubte das Abschneiden des N-terminalen GST-tags durch eine spezifische Protease. So wurden Proteine gewonnen, die um nur vier Reste am N-Terminus verlängert sind (Glycin-Prolin-Leucin-Glycin) und deren Startmethionin gegen Serin ausgetauscht ist. Die

Proteinpräparationen zeichneten sich durch eine hohe Stabilität und Homogenität aus. Der Anteil verunreinigender Proteine lag unter 10 %.

In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass die Kinase-Aktivität des KaiC₇₉₄₂ bei niedrigen Temperaturen gegenüber der Dephosphorylierungs-Aktivität überwiegt [78,99,110]. Bei für das Wachstum von *Synechococcus* optimalen Temperaturen, beeinflussen KaiA₇₉₄₂ und KaiB₇₉₄₂ die Phosphorylierung des KaiC₇₉₄₂ antagonistisch und interagieren zudem bevorzugt mit bestimmten Phosphorylierungsformen des KaiC₇₉₄₂ (siehe z.B. Übersichtsartikel 201). Vor diesem Hintergrund sollte zuerst überprüft werden, inwiefern sich die KaiC-Phosphorylierung und -Komplexbildung in Anwesenheit von KaiA₇₉₄₂ und KaiB₇₉₄₂ bei 4 °C und 30 °C unterscheiden. KaiC₇₉₄₂ wurde mit KaiA₇₉₄₂ und KaiB₇₉₄₂ für 0-24 Stunden bei der für *Synechococcus* optimalen Wachstumstemperatur (30 °C) sowie bei niedriger Temperatur (4 °C) inkubiert. Der Grad der KaiC₇₉₄₂-Phosphorylierung wurde anschließend durch elektrophoretische Separation der Phosphorylierungsstufen in einem hoch auflösenden PAA-Gel analysiert (Abbildung 2-1.A, oben), da die phosphorylierten Formen von KaiC in diesem System langsamer migrieren als die dephosphorylierte Form [56,92]. Die Intensität der Coomassie gefärbten Proteinbanden wurde quantifiziert und anhand dessen der Anteil der phosphorylierten Formen des KaiC₇₉₄₂ am Gesamt-KaiC₇₉₄₂ berechnet.

Zu Beginn des Experiments (0 h) wies das Protein einen Phosphorylierungsgrad von ca. 46 % auf. Dieser stieg bei der Inkubation bei 30 °C zunächst auf 69 % an und ging dann wieder auf 42 % zurück, was den typischen Zyklus der Autophosphorylierung und -dephosphorylierung von KaiC₇₉₄₂ andeutete. Bei 4 °C hingegen akkumulierten die phosphorylierten Formen von KaiC stetig und das Protein lag nach 24 Stunden zu 64 % phosphoryliert vor. Die Phosphorylierung blieb auch bei verlängerter Inkubation auf einem hohen Niveau: In zwei unabhängigen Reaktionsansätzen wurden KaiA₇₉₄₂, KaiB₇₉₄₂ und KaiC₇₉₄₂ für sieben Tage bei 4 °C inkubiert. Danach lag der Anteil an phosphoryliertem KaiC bei 66 ± 1 % (nicht gezeigt).

Die stetige Phosphorylierung bei 4 °C ging bei der 24-stündigen Inkubation mit einem veränderten Muster der Komplexbildung einher, wie die Auftrennung in einem nativen PAA-Gel zeigte. Wurden die Proteine bei der unabhängigen, verlängerten Kontroll-Inkubation bei 4 °C einzeln in Anwesenheit von 1 mM ATP separiert, lief KaiA₇₉₄₂ als Monomer und Dimer, KaiC₇₉₄₂ als Hexamer und KaiB₇₉₄₂ formte eine diffuse Bande knapp unterhalb der Oberkante des Gels (Abbildung 2-1.B). Infolge der Inkubation bei 30 °C erschienen nach vier und acht Stunden über dem KaiC₇₉₄₂-Hexamer zwei Banden, die bei längerer Inkubation wieder

verschwanden. Bei 4 °C hingegen nahm die Stärke dieser Protein-Komplexe kontinuierlich zu (Abbildung 2-1.A, unten). Aufgrund publizierter Daten zur Analyse der Kai-Komplexe durch native PAGE [110,111] sowie eigener weiterführender Analysen (siehe auch Abbildung 2-2) wurde angenommen, dass es sich hier um KaiC₇₉₄₂-KaiB₇₉₄₂-Komplexe sowie Komplexe aus allen drei Kai-Proteinen handelte. KaiC-KaiA-Komplexe wurden nicht detektiert, da sie nur in Anwesenheit des nicht hydrolysierbaren ATP-Analogs AMP-PNP ausreichend stabil sind [102]. Insgesamt zeigte sich bei 30 °C eine oszillierende Assemblierung der Kai₇₉₄₂-Proteine. Bei 4 °C hingegen wurden die Kai-Protein-Komplexe angereichert.

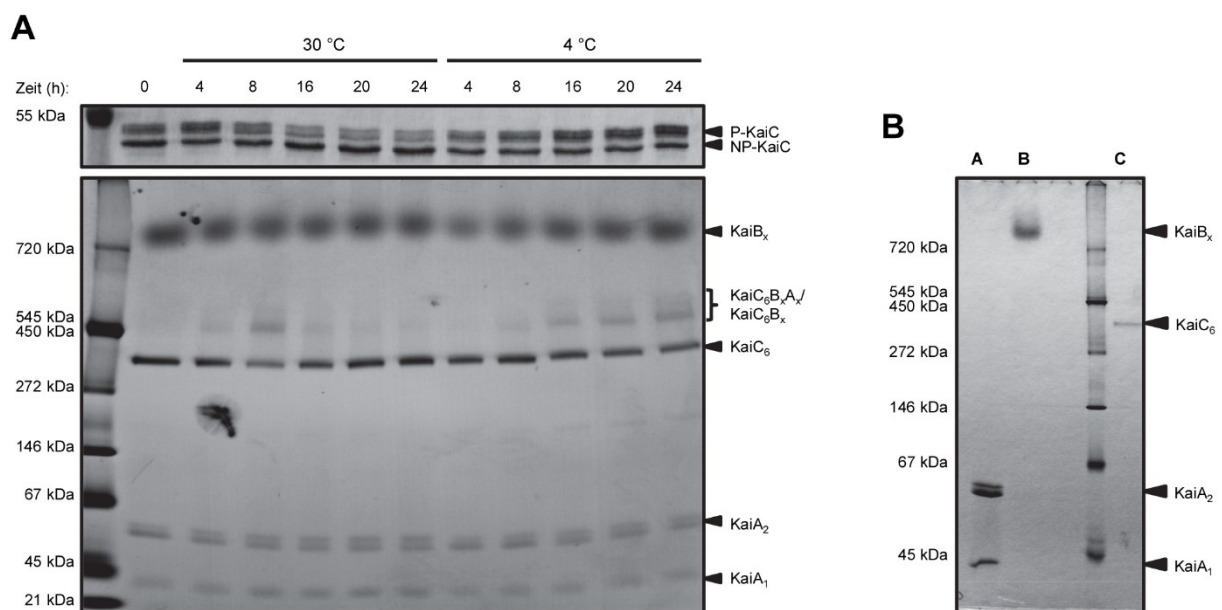


Abbildung 2-1. Zeitaufgelöste Analyse der temperaturabhängigen KaiC₇₉₄₂-Phosphorylierung und Komplexbildung. A. Infolge der stetigen Phosphorylierung interagiert KaiC₇₉₄₂ bei 4 °C zunehmend mit KaiB₇₉₄₂ und KaiA₇₉₄₂. KaiC₇₉₄₂ (KaiC), KaiB₇₉₄₂ (KaiB) und KaiA₇₉₄₂ (KaiA) wurden in einem molaren Verhältnis von 2:6:1 in Puffer mit 1 mM ATP gemischt, aliquotiert und eingefroren. Einzelne Reaktionsansätze wurden schrittweise aufgetaut, bei 30 °C bzw. 4 °C inkubiert und die Proteine mittels denaturierender SDS-PAGE (oben) sowie durch native PAGE (unten) aufgetrennt. Dargestellt ist die Coomassiefärbung der Proteine. Über dem Gel sind die jeweilige Dauer der Inkubation vor der Elektrophorese in Stunden (h) sowie die Inkubationstemperatur angegeben. P-KaiC und NP-KaiC markieren phosphoryliertes bzw. dephosphoryliertes KaiC₇₉₄₂. Die Indizes hinter den Kai-Proteinen geben den Oligomerisierungszustand an, wobei die Zahl der KaiA₇₉₄₂- und KaiB₇₉₄₂-Moleküle im Komplex mit KaiC₇₉₄₂ sowie der Oligomerisierungszustand des KaiB₇₉₄₂ nicht näher definiert wurde. B. **Größenkontrolle.** Um die Proteine nach Separation durch native PAGE eindeutig zuordnen zu können, wurden KaiA₇₉₄₂ (A), KaiB₇₉₄₂ (B) und KaiC₇₉₄₂ (C) in einer unabhängigen Analyse nach Inkubation bei 4 °C einzeln separiert. Die Beschriftung erfolgte wie analog zu A.

Diese Tatsache, dass sowohl die Menge phosphorylierten KaiC₇₉₄₂ als auch die Bildung von Komplexen aus KaiC₇₉₄₂ und KaiB₇₉₄₂ und/oder KaiA₇₉₄₂ bei 4 °C stetig zunahm, sollte sich zunutze gemacht werden, um die Interaktion von KaiB₇₉₄₂ und KaiC₇₉₄₂ weitergehend zu analysieren.

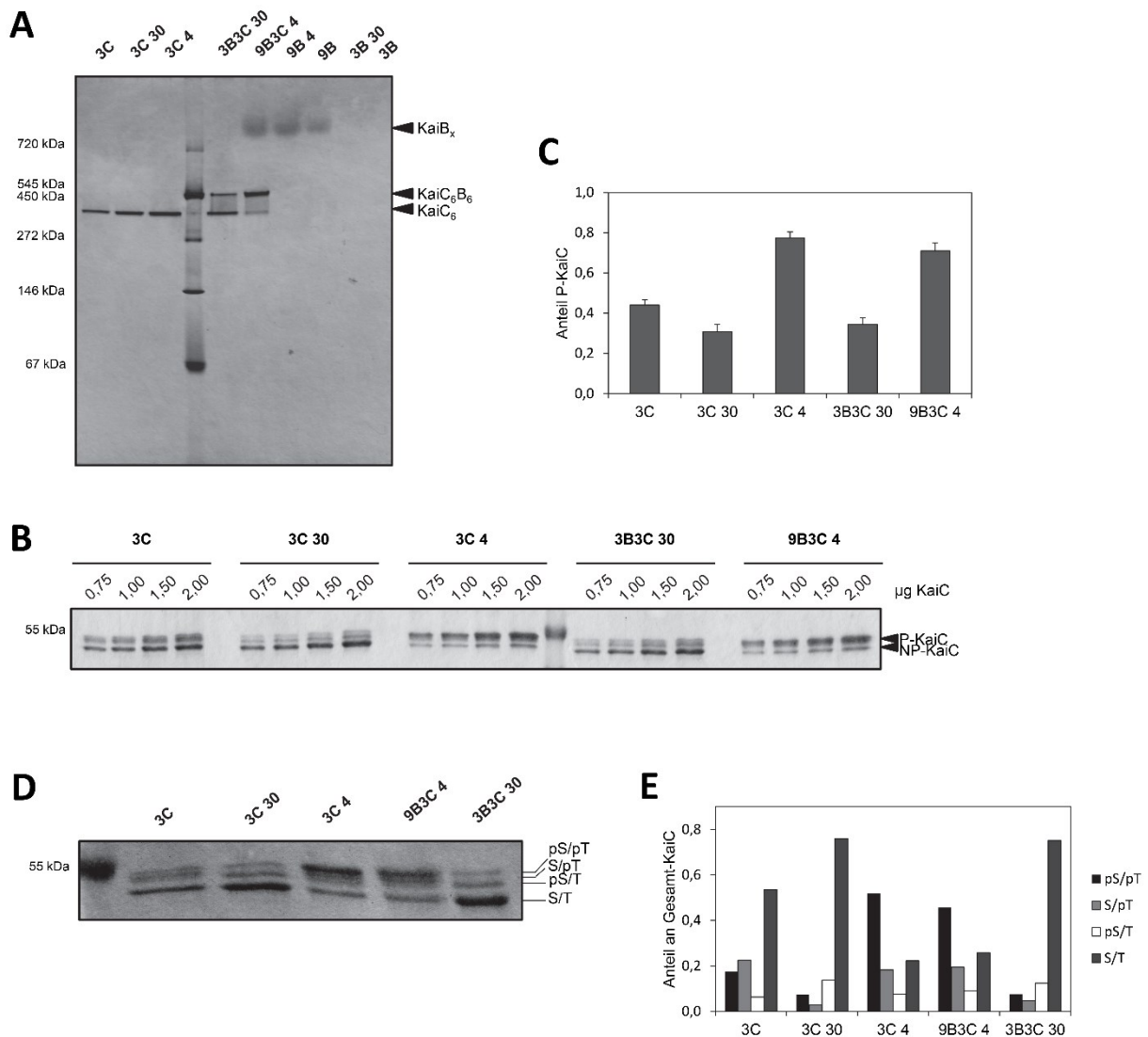


Abbildung 2-2. Vergleich der KaiC₇₉₄₂-KaiB₇₉₄₂-Komplexbildung und KaiC₇₉₄₂-Phosphorylierung nach kurzer Inkubation bei 30 °C und langer Inkubation bei 4 °C. A. Nach einwöchiger Inkubation bei niedrigen Temperaturen war die Zahl an KaiC₇₉₄₂-KaiB₇₉₄₂-Komplexen erhöht. 3 µM KaiC₇₉₄₂ wurden entweder in äquimolarem Verhältnis mit KaiB₇₉₄₂ für sechs Stunden bei 30 °C (3B3C 30) oder für sieben Tage mit einem Überschuss an KaiB₇₉₄₂ (9 µM) bei 4 °C inkubiert (9B3C 4) und die Protein-Komplexe anschließend unter nativen Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur eindeutigen Zuordnung und um eine Proteindegradation oder –aggregation auszuschließen, wurden auch Proteine analysiert, die einzeln bei 30 °C (3C 30 und 3B 30), 4 °C (3C 4 und 9B 4) oder bei -20 °C (3C, 3B, und 9B) inkubiert worden waren. Gezeigt ist die Coomassiefärbung der separierten Proteine. B,C. Der Anteil an phosphoryliertem KaiC₇₉₄₂ war nach Inkubation bei 4 °C maximiert. KaiC₇₉₄₂ wurde in An- und Abwesenheit von KaiB₇₉₄₂, wie unter A beschrieben, dreimal unabhängig voneinander inkubiert und jeweils zweimal durch SDS-PAGE (PAA-Gel mit 11 % T, 0,67 % C) aufgetrennt. Dabei wurden pro Inkubationsbedingung vier verschiedene Proteinmengen (0,75 µg, 1 µg, 1,5 µg, 2 µg) aufgetragen. Anschließend wurde jeweils die Signalintensität der langsamer migrierenden Banden (phosphorylierte Formen des KaiC₇₉₄₂ (P-KaiC)) durch die Signalintensität aller Banden (nicht-phosphoryliertes KaiC₇₉₄₂ (NP-KaiC) + P-KaiC) geteilt und somit der Anteil an phosphoryliertem KaiC₇₉₄₂ berechnet. Eine Unterscheidung zwischen KaiC₇₉₄₂^{S/pT}, KaiC₇₉₄₂^{pS/pT} und KaiC₇₉₄₂^{pS/T} erfolgte nicht. Gezeigt sind ein exemplarisches Gel nach Coomassiefärbung der Proteine (B) und die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 6 Gelanalysen (C). D,E. Nach Inkubation bei 30 °C wurde KaiC₇₉₄₂^{S/T}, bei 4 °C hingegen KaiC₇₉₄₂^{pS/pT} angereichert. Die Kai₇₉₄₂-Proteine wurden, wie in A beschrieben, inkubiert, in einem PAA-Gel mit ca. 8 cm Laufstrecke aufgetrennt, die Banden nach Coomassiefärbung entsprechend der Beschreibung in Nishiwaki *et al.* [85] zugeordnet (D) und der relative Anteil der Phosphorylierungsformen anhand der Signalintensität der vier Banden berechnet (E). Es sei darauf hingewiesen, dass die Proben 9B3C 4 und 3B3C 30 in den Abbildungen B und C im Vergleich zu D und E in vertauschter Reihenfolge aufgetragen wurden.

Um KaiC₇₉₄₂ möglichst vollständig mit KaiB₇₉₄₂ zu besetzen, wurde es mit einem Überschuss an KaiB₇₉₄₂ (molares Verhältnis von 1:3, KaiC₇₉₄₂:KaiB₇₉₄₂) für eine Woche bei 4 °C inkubiert. Eine anschließende Auftrennung unter nativen Bedingungen zeigte, dass dadurch das Verhältnis von KaiC₇₉₄₂-KaiB₇₉₄₂-Komplexen zu freien KaiC₇₉₄₂-Hexameren im Vergleich zur Inkubation unter Standardbedingungen (30 °C, molares Verhältnis von 1:1, KaiC₇₉₄₂:KaiB₇₉₄₂) stark erhöht werden konnte. Die Bande, die den KaiC₇₉₄₂-KaiB₇₉₄₂-Komplex repräsentierte, nahm deutlich zu, die Bande des hexameren KaiC₇₉₄₂ hingegen ab (Abbildung 2-2.A). Allgemein war unter beiden Bedingungen die Bande, die den KaiC₇₉₄₂-KaiB₇₉₄₂-Komplex repräsentierte, distinkter als in Anwesenheit von KaiA₇₉₄₂ (vergleiche Abbildung 2-1.A und Abbildung 2-2.A).

Da KaiB₇₉₄₂ bevorzugt phosphoryliertes KaiC₇₉₄₂ bindet [84,85], wurde der Grad der Phosphorylierung mittels SDS-PAGE bestimmt (Abbildung 2-2.B). Dieser war ungeachtet der Anwesenheit KaiB₇₉₄₂ nach Inkubation bei 4 °C im Vergleich zur Ausgangsprobe erhöht und lag bei $77 \pm 3 \%$ (KaiC₇₉₄₂) bzw. $71 \pm 4 \%$ (KaiC₇₉₄₂+KaiB₇₉₄₂). Bei 30 °C hingegen sank der Anteil phosphorylierten KaiC₇₉₄₂ sowohl in Ab- als auch Anwesenheit von KaiB₇₉₄₂ auf $31 \pm 4 \%$ bzw. $34 \pm 3 \%$ (Abbildung 2-2.C). Um die Abundanz der einzelnen KaiC₇₉₄₂-Phosphorylierungsstufen infolge der unterschiedlichen Inkubationen zu vergleichen, wurden Proben aus einem unabhängigen Reaktionsansatz exemplarisch in einem PAA-Gel mit längerer Laufstrecke aufgetrennt (Abbildung 2-2.D,E). Nach Inkubation bei 30 °C dominierte KaiC₇₉₄₂^{S/T} (ca. 80 % aller Phosphorylierungsstufen), bei 4 °C dagegen KaiC₇₉₄₂^{pS/pT} (ca. 50 %). Die zweitabundanteste Form nach Inkubation bei Standardtemperatur war KaiC₇₉₄₂^{pS/T}, bei niedriger Temperatur KaiC₇₉₄₂^{S/T}.

Abschließend sollte überprüft werden, ob der hohe Phosphorylierungsgrad bei niedriger Temperatur alleinig auf eine Verschiebung des Gleichgewichts zur Autokinase-Aktivität zurückging oder aber die Fähigkeit zur Dephosphorylierung verloren gegangen war. Dafür wurde KaiC₇₉₄₂ für eine Woche bei 4 °C inkubiert und anschließend auf 30 °C temperiert. Nach sechsständiger Inkubation befand sich KaiC₇₉₄₂ eindeutig in der Dephosphorylierungsphase (Abbildung 2-3): Während das Ausgangsprotein (Kontrolle) vor und nach der Inkubation bei 30 °C primär dephosphoryliert vorlag, war das bei niedriger Temperatur inkubierte KaiC₇₉₄₂ - wie bereits zuvor beobachtet - stark phosphoryliert. Es dominierte die KaiC₇₉₄₂^{pS/pT}-Form. Nach der Inkubation bei 30 °C hingegen war die KaiC₇₉₄₂^{pS/T}-Form sowohl im Vergleich zum Ausgangsprotein als auch dem zuvor bei 4 °C inkubierten KaiC₇₉₄₂ deutlich angereichert.

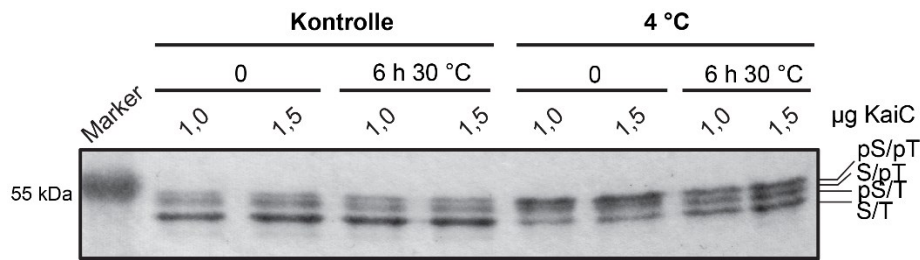


Abbildung 2-3. Kontrollanalyse zur *in vitro* Aktivität des KaiC₇₉₄₂ nach langer Inkubation bei 4 °C - Die Fähigkeit zur Autodephosphorylierung blieb erhalten. 3 µM KaiC₇₉₄₂ wurden einmal bei -20 °C gelagert (Kontrolle) und einmal für eine Woche bei 4 °C inkubiert (4 °C). Anschließend wurde je ein Aliquot eingefroren (0) und je ein Aliquot für sechs Stunden bei 30 °C inkubiert (6 h 30 °C). Pro Ansatz wurden 1 µg und 1,5 µg KaiC₇₉₄₂ auf ein PAA-Gel (11 %T, 0,67 % C) geladen und die Phosphorylierungsformen (KaiC₇₉₄₂^{pS/pT} (pS/pT), KaiC₇₉₄₂^{S/pT} (S/pT), KaiC₇₉₄₂^{pS/T} (pS/T) und KaiC₇₉₄₂^{S/T} (S/T)) elektrophoretisch separiert. Dargestellt ist die Coomassiefärbung der Proteine.

Zusammenfassend wurde hier durch die verlängerte Inkubation bei 4 °C eine Anreicherung von KaiC₇₉₄₂^{pS/pT} und verstärkte Bildung von KaiC₇₉₄₂-KaiB₇₉₄₂-Komplexen erzielt, bei der die Aktivität des KaiC₇₉₄₂ voll erhalten blieb.

2.2 Charakterisierung der multiplen Kai Proteine in *Synechocystis*

Mithilfe der zuvor beschriebenen Analysen wurden weitere Details zum molekularen Oszillator im Modellorganismus *Synechococcus* gewonnen. Der Hauptfokus dieser Arbeit lag jedoch auf einer Charakterisierung der multiplen Kai-Proteine in *Synechocystis*, deren Funktion und biochemische Eigenschaften nahezu unbekannt waren. Hier sollten zunächst aufgrund von *in silico* Sequenzvergleichen im Zusammenhang mit der Literatur Vorhersagen zu Aktivität und Zusammenspiel der Kai-Homologe getroffen werden. Auf Basis dieser Vorhersagen wurden *in vitro* Studien zu den laut Aoki und Onai [196] in die zeitliche Kontrolle involvierten Proteine KaiA₆₈₀₃, KaiB1, KaiC1, KaiB3 und KaiC3 durchgeführt. Abschließend galt es das zeitliche und räumliche Verhalten der Kai-Homologe in der Zelle im Zusammenhang mit einer potenziellen zeitlichen Koordination in *Synechocystis* aufzulösen.

2.2.1 *In silico* Vorhersagen zu den multiplen Kai-Proteinen in *Synechocystis*

Anhand einer phylogenetischen Rekonstruktion wurde gezeigt, dass KaiC1, KaiC2 und KaiC3 drei Untergruppen prokaryotischer KaiC-Proteine repräsentieren (Christian Beck, [183]). Dies schlägt sich in der Sequenzidentität der KaiC-Homologe nieder, welche durch BLAST Analysen ermittelt wurde: Während KaiC1 82 % Identität zu KaiC₇₉₄₂ aufweist, liegt die Identität von KaiC3 zu KaiC₇₉₄₂ und KaiC1 bei nur 55 %. KaiC2 ist sogar nur zu 36-38 % mit KaiC₇₉₄₂, KaiC1 und KaiC3 identisch. Der Unterschied von KaiC2 zu den anderen Homologen

äußert sich zudem in einem verlängerten C-Terminus (Abbildung 2-4). Auch die KaiB-Proteine aus *Synechocystis* repräsentieren divergierte Untergruppen [197]. KaiB1 weist die größte Identität zu KaiB₇₉₄₂ auf (88 %), gefolgt von KaiB2 (52 %) und KaiB3 (48 %). Untereinander sind die KaiB-Homologe zu 53 % (KaiB1 und KaiB2), 52 % (KaiB2 und KaiB3) bzw. 47 % (KaiB1 und KaiB3) identisch. Ein Vergleich der KaiC-Proteine aus *Synechococcus* und *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (KaiC_{BP-1}) demonstrierte, dass selbst kleine Sequenzunterschiede geringe Konformationsänderungen verursachen [72]. Dies lässt vermuten, dass die Modifikationen in den *Synechocystis* Proteinen von funktioneller Relevanz sind. Daher wurden Sequenzalignments erstellt, um Vorhersagen zur Aktivität und Interaktion aller Kai-Proteine zu treffen. Dazu wurden die Sequenzen der *Synechocystis* KaiC-Proteine mit jenen der intensiv studierten Homologe KaiC₇₉₄₂ und KaiC_{BP-1} verglichen (Abbildung 2-4). Darüber hinaus ist in Abbildung 2-5 ein Sequenzvergleich der KaiB-Homologe aus *Synechocystis* mit den charakterisierten Proteinen aus *Synechococcus*, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (KaiB_{BP-1}), *Prochlorococcus marinus* MED4 (KaiB_{MED4}) sowie *Legionella pneumophila* str. Paris (KaiB_{lpp}) gezeigt.

Die drei KaiC-Homologe weisen in der CII-Domäne (Reste 252-519 in KaiC₇₉₄₂ [72], violett markiert in Abbildung 2-4) alle Motive auf, die für die Phosphorylierung und Dephosphorylierung (durch ATP-Synthese und -Hydrolyse) des KaiC₇₉₄₂ relevant sind. So besitzen sie das Walker-Motiv A¹ (*P-Loop*, orange umrandet in Abbildung 2-4, [53,75,202]), an welches ATP bindet [75] sowie das verkürzte Walker Motiv B², (WalkerB, dunkelrot umrandet in Abbildung 2-4, [53,77,202]). Auch die katalytische Base für die Autokinase- und Dephosphorylierungs-Aktivität in KaiC₇₉₄₂ (E318) sowie der zweite an der Katalyse beteiligte Glutamatrest sind vorhanden (EE, gelb umrandet in Abbildung 2-4, [79,90]). Zudem findet sich der Arginin-Finger (R-Finger, braun umrandet in Abbildung 2-4), der das γ -Phosphat des ATPs kontaktiert [72]. Die Hauptphosphorylierungsstellen (P-Stellen, rot umrandet in Abbildung 2-4) des KaiC₇₉₄₂ sind in KaiC1 (S432/T433) und KaiC3 (S423/T424) identisch. KaiC2 besitzt anstelle des Threonins eine konservative Substitution durch Serin (an Position 424). Auch die labile, in die Dephosphorylierung involvierte Phosphorylierungsstelle (T426 in KaiC₇₉₄₂, umrandet mit roter unterbrochener Linie in Abbildung 2-4) ist durchweg konserviert. Folglich ist für alle drei KaiC-Proteine eine Kinase- und Dephosphorylierungs-Aktivität anzunehmen.

¹ GXXXXGKT; X steht für eine beliebige Aminosäure

² hhhhD; h steht für eine hydrophobe Aminosäure

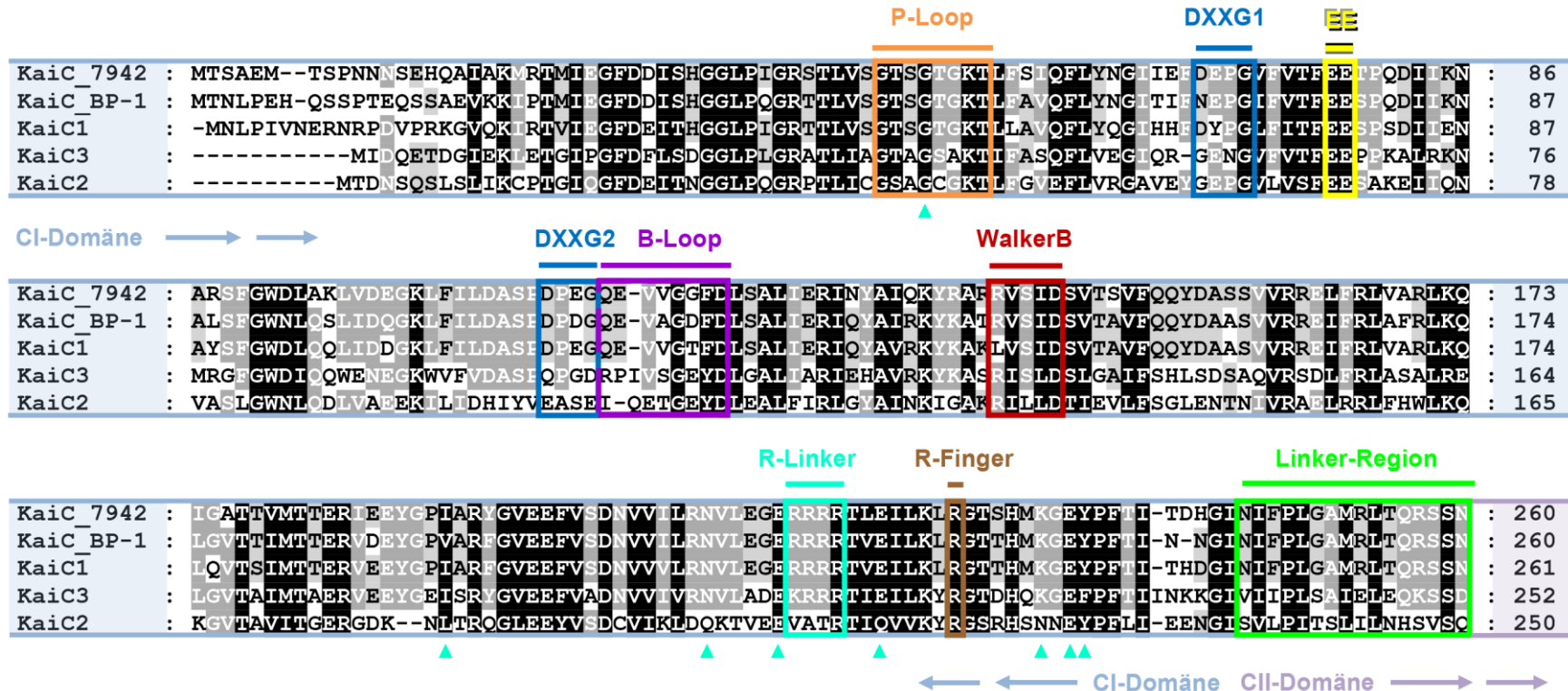


Abbildung 2-4. Alignment der Aminosäuresequenzen von KaiC1, KaiC2 und KaiC3 im Vergleich zu den Sequenzen der gut charakterisierten Homologe aus *Synechococcus* (KaiC_7942) und *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (KaiC_BP-1). Hier sind die CI-Domäne sowie die Linker-Region gezeigt, die der CII-Domäne zugehörig ist. Die Darstellung der CII-Domäne folgt auf der nächsten Seite. Das Layout entspricht weitestgehend einem vergleichbaren Alignment der Sequenzen mariner KaiC-Proteine, welches im Zeitraum dieser Arbeit für einen Übersichtsartikel in *Marine Genomics* erstellt wurde [142]. Die Sequenzen sind nach ihrer Identität zu KaiC₇₉₄₂ sortiert und der Konservierungsgrad ist in Graustufen angegeben: weiße Schrift auf schwarzem Grund - 100 % Konservierung, weiße Schrift auf dunkelgrauem Grund - 80 % Konservierung, schwarze Schrift auf hellgrauem Grund - 60 % Konservierung. Für weitere Informationen zu den farblich markierten Motiven und Aminosäuren sowie den zugehörigen Referenzen siehe Text.

P-Loop EE

KaiC_7942	: VRVSSGVRLDEMCGG-GFFKDSIILATGATGTGKTILVSRFVENACANKERATLEAYEESRAQLLRNAYSWGMDTEEMERQNLKIV	: 347
KaiC_BP-1	: VRVSSGVKTLDDEMCGG-GFFKDSIILATGATGTGKTILVSKFLETGCGQGERALLFAYEESRAQLSRNASSWGIDFEELERRGILRII	: 347
KaiC1	: ARISSGVQTLDEMCGG-GFFKDSIILATGATGTGKTILVSKFLQEGCRQRRERAILFAYEESRAQLSRNASSWGIDFEEMEHKGILKLL	: 348
KaiC3	: IRITSGSEELDRMCGS-GFFRDSIILVSGATGTGKTIMVTEFDGGVANGERCLVAFEESEQLIRNATGNGVDKQMEKEGKLKVV	: 339
KaiC2	: ERISTGIPQLDDMEGEGGYRGSILVTERAGTGKTILAAFTACATLGRERCLYLATEESPOQICRNLSIGLDLSPYLDSQLQFD	: 338

WalkerB 422-Loop P-Stellen

KaiC_7942	: CAYPESAGLEDHLQIIKSEINDFKPARIAIDLSALARGVSNNAFROFVIGVIGYAKOEITCGLETTNTSDQFMGA-HSITDSHISTIT	: 434
KaiC_BP-1	: CAYPESAGLEDHLQIIKSEIADFKPSRVAIDLSALARGVSNNAFROFVIGVIGYAKOEITCGLETTNTTDQFMGS-NSITESHISTIT	: 434
KaiC1	: CTYPESAGLEDHLQIIKSEISEFKPSRIAIDLSALARGVSNNAFROFVIGVIGYAKOEITCGLETTNTTDQFMGA-HSITESHISTIT	: 435
KaiC3	: CRYPETTNLENHLIMMDIIOEFKPNRVAVDLSALERVSLKSEREFHIGLSEFIKQOQIGSEITTSITPNLLGG-ASITDAHISTIT	: 426
KaiC2	: ATRPTNYNLEMRLEFKLHSWRNFKPSLVVVDPMNLTITSGNLNQTKNFEMRLIDYLSOKIIVFLTDLTGGNVGYDNEQTEVGVSSLM	: 426

438-444 R-Linker R-Finger A-Loop

KaiC_7942	: DTIILLQYVEIRGEMSRAINVEKMRGSHWDKAIREFMISDKGPDIKDSFRNFERIISGSPTRINVEKSELRSRIVRGVQEKGPES---	: 519
KaiC_BP-1	: DTIILLQYVEIRGEMSRAINVEKMRGSHWDKGIREYVIEKGAIEIRDSFRNFEIISGTPTRISVDEKTELARIAGMQDLESE----	: 518
KaiC1	: DTIILLQYVEIRGEMSRAINVEKMRGSHWDKGIREYSISHDGPDIRDSFRNFERIISGSPTRISVDEKSELRSRIVRGVKDKTAE----	: 519
KaiC3	: DSIIILLRVEMYGERREITIVLKMRS-MHDKDIRFSIDHQMHIGKPFNRNVITGIIAGTMYTAQSEVERLSGFDEKI-----	: 505
KaiC2	: DTWLELOTLRINGERNRILYILKSRMAHSNOVREFTILNDEVDLIEAVIGEGOVLIGTORINDLEEEAIAARRQQAELSKRNFER	: 514

KaiC_7942	: -----	: -
KaiC_BP-1	: -----	: -
KaiC1	: -----	: -
KaiC3	: -----	: -
KaiC2	: KKYLLOAKIDALQMKLASQDEELEVLMLEEKEFKQTMLANRNLIKKSRHIYQNP	: 568

← ← CII-Domäne

Fraglich ist ob die Kinase-Aktivität von KaiC2 und KaiC3 durch KaiA₆₈₀₃ beeinflusst werden kann. Die Reste, die in KaiC_{BP-1} über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen sowie durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit KaiA_{BP-1} interagieren (grüne Dreiecke unterhalb der Sequenz in Abbildung 2-4, [97,197]), sind in den KaiC-Homologen unterschiedlich konserviert. In KaiC1 sind die meisten Reste identisch oder ähnlich und die Bindung von KaiA₆₈₀₃ somit sehr wahrscheinlich. In KaiC2 und KaiC3 hingegen könnte die Assoziation von KaiA₆₈₀₃ aufgrund einer geringen Konservierung der entsprechenden Aminosäuren gestört sein. Auch der *A-Loop* (Reste 487-497 in KaiC₇₉₄₂, grün umrandet in Abbildung 2-4, [70]), dessen Konformation das Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung beeinflusst [95], ist in KaiC1 nahezu identisch, während KaiC2 und KaiC3 weniger als 50 % Konservierung aufweisen. In KaiC₇₉₄₂ wird die geborgene *A-Loop*-Konformation durch Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb (R488-T495) und zwischen den KaiC-Monomeren (E487-T495) stabilisiert [70,95]. Zudem trägt ein hydrophobes *Cluster* C-terminaler Reste zur Stabilisierung bei (schwarze Kreise oberhalb der Sequenzen in Abbildung 2-4, [95]). Erneut ist eine hohe Konservierung in KaiC1 zu beobachten. Jedoch sind in KaiC2 und KaiC3 weder T495 noch E487 oder R488 vorhanden und zudem einige der stabilisierenden Reste ausgetauscht. Hier ist vor allem das Fehlen eines Isoleucin (an Position 497 in KaiC₇₉₄₂) auffällig, dessen Mutation zur dauerhaften Exposition des *A-Loops* in KaiC₇₉₄₂ führt [95]. Es sind sogar die Bereiche deutlich modifiziert, die in KaiC₇₉₄₂ ein Interaktionsnetzwerk ausbilden, durch das die geborgenen *A-Loops* letztendlich die Phosphorylierung sterisch inhibieren (Reste 438-444³, hellblau umrandet in Abbildung 2-4; 422-*Loop*⁴, pink umrandet in Abbildung 2-4 [70,95]). KaiC1 wiederum weist die am Interaktionsnetzwerk beteiligten Reste auf. Insofern ist davon auszugehen, dass die Wechselwirkungen zwischen KaiC1 und KaiA₆₈₀₃ vergleichbar zu den *Synechococcus* Orthologen ablaufen und KaiA₆₈₀₃ die Kinase-Aktivität von KaiC1 stimulieren kann. KaiC2 und KaiC3 hingegen könnten eine mangelnde Interaktion mit KaiA durch eine konstante, auf den geschwächten Wechselwirkungen basierende, Exposition der *A-Loops* kompensieren.

Für alle drei KaiC-Homologe lässt sich anhand des Alignments eine ATPase-Aktivität in der CI-Domäne (Reste 1-251 in KaiC₇₉₄₂ [72], hellblau markiert in Abbildung 2-4) vorhersagen: Alle KaiC besitzen einen *P-Loop*, (orange umrandet in Abbildung 2-4 [53,202]) und die

³ verknüpfen den *A-Loop* und *P-Loop* [70,95]

⁴ verknüpft *A-Loop* und Phosphorylierungsstellen [70,95]

katalytischen Glutamatreste (EE, gelb umrandet in Abbildung 2-4), von denen E77 (in KaiC₇₉₄₂) als katalytische Base fungiert [79,90]. Zudem ist der Arginin-Finger (R-Finger, braun umrandet in Abbildung 2-4) vorhanden, der den γ -Phosphatrest des ATPs kontaktiert [72].

Die ATPase-Aktivität in der CI-Domäne von KaiC1 ist vermutlich mit der Phosphorylierung in der CII-Domäne und somit mit der Assoziation von KaiA und KaiB (s.u.) verknüpft: Sowohl die Linker-Region (245-260, grüner Kasten in Abbildung 2-4) als auch die Arginin-Linker (Reste 216-219 und 451, R-Linker, mintgrün umrandet in Abbildung 2-4,[72]) sind hier hoch konserviert. Letztere bilden in KaiC_{BP-1} eine Reihe von Interaktionen aus, durch die sie strukturelle Veränderungen zwischen der CI- und CII-Domäne vermitteln [72]. Die an diesem Interaktionsnetzwerk beteiligten Reste (mintgrüne Dreiecke unterhalb der Sequenz in Abbildung 2-4) sind in KaiC1 identisch oder konservativ substituiert. Auch in KaiC3 ist eine funktionelle Verknüpfung der Domänen denkbar, da dem (hier konservierten) Arginin-Linker-Netzwerk bei der strukturellen Kopplung eine bedeutendere Rolle als der (hier leicht modifizierten) Linkersequenz zukommt [72]. In KaiC2 hingegen sind weder die Arginin-Linker in der CI-Domäne und die damit interagierenden Reste, noch die Linker-Sequenz konserviert. Darum ist anzunehmen, dass die Aktivitäten in den einzelnen Domänen voneinander entkoppelt sind.

Derzeit wird kontrovers diskutiert ob, KaiB₇₉₄₂ an den CI- oder CII-Ring des KaiC₇₉₄₂ bindet. Dies ist in Abschnitt 3.1.2 ausführlich dargestellt, da in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Albert J. R. Heck ein Modell aufgestellt wurde, das die KaiB₇₉₄₂-Bindung an den CII-Ring des KaiC₇₉₄₂ favorisiert [203]. Die Reste in der CII-Domäne des KaiC₇₉₄₂, die nach unserem (violette Sterne in Abbildung 2-4, [203]) sowie einem Kryo-EM basierten Modell von Villareal und Mitarbeitern (violette Kreise in Abbildung 2-4, [200]) eine Bindung mit KaiB₇₉₄₂ eingehen, sind in KaiC1 hochgradig konserviert. Gleiches gilt für das Motiv, das für die alternative Bindung an die CI-Domäne verantwortlich sein soll (*B-Loop*, violett umrandet in Abbildung 2-5, [96]). Auch in KaiB1 sind die Aminosäuren des KaiB₇₉₄₂, die nach unserer *in silico* Rekonstruktion (türkise und violette Sterne in Abbildung 2-5, [203]) sowie der Simulation von Villarreal *et al.* (violette Kreise in Abbildung 2-5, [200]) mit KaiC₇₉₄₂ interagieren, stark konserviert. Daher ist eine Assemblierung von KaiC1-KaiB1-Komplexen anzunehmen. In KaiC2 und KaiC3 ist dagegen nur eine geringe Konservierung der beschriebenen Aminosäuren zu verzeichnen und demnach allenfalls eine schwache Interaktion mit KaiB1 zu erwarten. Ggf. sind die Interaktionsflächen für eine Bindung der anderen KaiB-Homologe optimiert.

Weniger als die Hälfte der an der Interaktion mit KaiC₇₉₄₂ beteiligten Reste sind in KaiB2 und KaiB3 konserviert. Dabei sind Aminosäuren, die Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden (türkise Sterne in Abbildung 2-5), stärker modifiziert als Reste, die in zusätzliche Wechselwirkungen (violette Sterne in Abbildung 2-5) involviert sind. KaiB2 weist zudem eine mit KaiB_{lpp} vergleichbare Verkürzung des C-Terminus auf. In KaiB_{lpp} konnte erst die Addition der 13 C-terminalen Reste von KaiB_{BP-1} (rote Dreiecke in Abbildung 2-5) infolge einer Ladungsänderung die - sonst nicht vorhandene - Interaktion mit KaiC_{lpp} vermitteln [204]. Insgesamt erscheint eine Bindung von KaiB2 an KaiC1 (als Ortholog des KaiC₇₉₄₂) daher unwahrscheinlich. Ob KaiB3 aufgrund der negativen Ladung des C-Terminus mit KaiC₇₉₄₂ bzw. KaiC1 interagieren kann, gilt es zu klären.

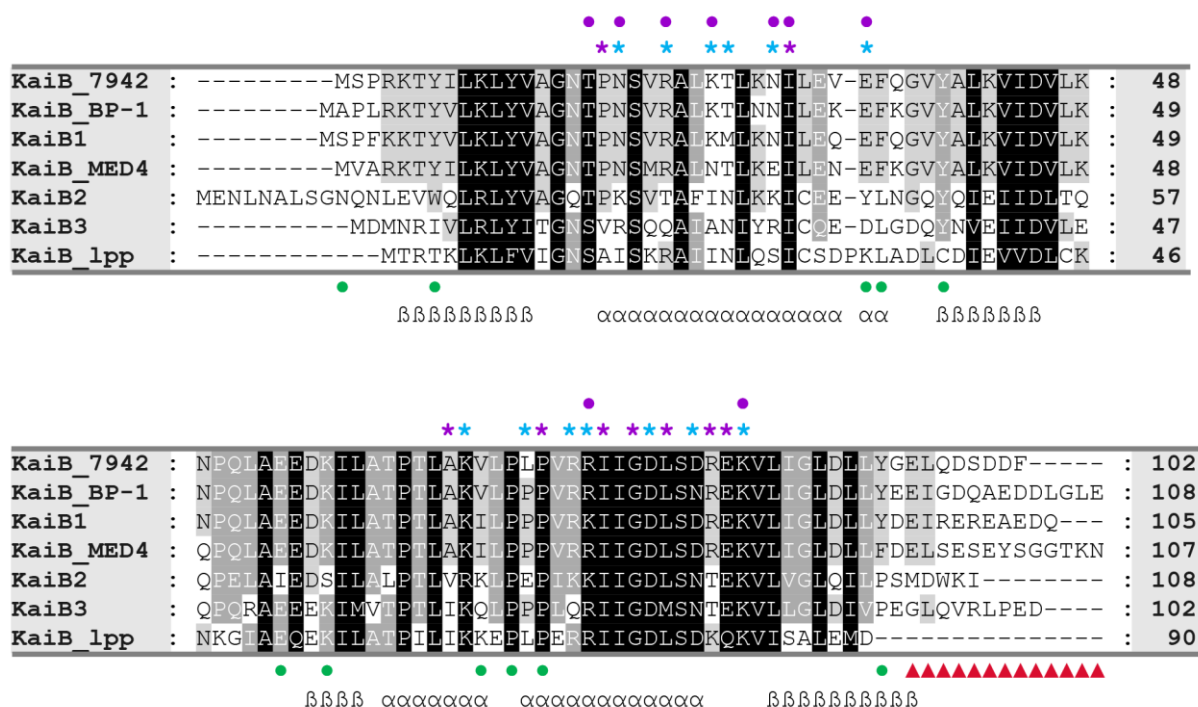


Abbildung 2-5. Alignment der Sequenzen von KaiB1, KaiB2 und KaiB3 mit Sequenzen ausgewählter bakterieller KaiB-Proteine, die bereits biochemisch charakterisiert wurden. Oben ist die N-terminale Hälfte, unten die C-terminale Hälfte dargestellt. Die Sequenzen sind nach ihrer Identität zu KaiB₇₉₄₂ sortiert und der Konservierungsgrad ist in Graustufen angegeben: weiße Schrift auf schwarzem Grund - 100 % Konservierung, weiße Schrift auf dunkelgrauem Grund – 80 % Konservierung, schwarze Schrift auf hellgrauem Grund – 60 % Konservierung. α und β markieren Aminosäuren, die in KaiC1 α-Helices bzw. β-Faltblätter ausbilden. Für weitere Informationen zu den farblich markierten Aminosäuren sowie den zugehörigen Referenzen siehe Text.

KaiB₇₉₄₂ interagiert als Monomer mit KaiC₇₉₄₂ (3.1, [200,203]). Durch native Massenspektrometrie (MS) wies Joost Snijder unter Benutzung des hier präparierten Proteins (2.1) nach, dass KaiB₇₉₄₂ in Lösung als Monomer, Dimer und Tetramer vorliegt [203]. Bei steigenden Gesamt-KaiB-Konzentrationen werden zunehmend Tetramere gebildet. Dies hält

die molare Konzentration der KaiB-Monomere relativ stabil und führt daher dazu, dass die effektive Monomerkonzentration gegen Schwankungen im Gesamt-KaiB-Level gepuffert ist [203]. In Abbildung 2-5 sind die Reste, die an der Tetramerisierung des KaiB1 beteiligt sind, markiert (grüne Kreise, [205]). Diese sind in KaiB2 und KaiB3 nicht konserviert. Dass die Sequenzen von KaiB1 und KaiB₇₉₄₂ hier gut übereinstimmen, dass der Mechanismus der konzenrationsabhängigen Tetramerisierung in KaiB1 ebenfalls vorhanden ist.

2.2.2 *In vitro* Studien zur Aktivität der multiplen Kai-Proteine in *Synechocystis*

Aufgrund der vorangegangenen Studien wurde vorhergesagt, dass KaiA₆₈₀₃ und KaiB1 ihre Orthologe aus *Synechococcus* substituieren können und die Phosphorylierung des KaiC1 in vergleichbarer Weise beeinflussen. Darum wurde die Phosphorylierung von KaiC₇₉₄₂ und KaiC1 in Abhängigkeit von KaiA₆₈₀₃ (und KaiB1) experimentell überprüft. Da für alle *Synechocystis* KaiC-Proteine eine Kinase-, ATP-Synthase- (Dephosphorylierungs-) und ATPase-Aktivität prognostiziert wurde, sollten diese Aktivitäten anschließend exemplarisch verifiziert werden. Es wurde KaiC3 als Hauptuntersuchungsobjekt ausgewählt, da es ein divergiertes KaiC-Protein repräsentiert, das neben KaiC1 in die Generierung circadianer Rhythmen involviert sein soll [196].

2.2.2.1 Heterologe Expression und Reinigung der Kai-Proteine

Zur näheren Charakterisierung von KaiA₆₈₀₃, KaiB1, KaiC1, KaiB3 und KaiC3 galt es diese in rekombinanter Form zu reinigen. Für die Kai-Proteine aus *Synechococcus* wurde bereits mehrfach beschrieben, dass sie nach heterologer Expression mit N-terminalem GST-tag in *E. coli* und anschließendem Entfernen des tags im Zuge einer Affinitätsreinigung funktional vorliegen [z.B. 56,60,63]. Auch in dieser Arbeit konnten so aktives KaiA₇₉₄₂, KaiB₇₉₄₂ und KaiC₇₉₄₂ präpariert werden (siehe Abschnitt 2.1). Darum wurden die kodierenden Sequenzen der *Synechocystis* Kai-Proteine ebenfalls unter Deletion des Start-ATGs in den pGEX-6P-1-Vektor ligiert und die resultierenden Plasmide zur heterologen Expression der GST-Fusionsproteine in *E. coli* verwendet. Zur zusätzlichen Expression von KaiB2 wurde ein entsprechendes Konstrukt von Anja K. Dörrich aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Annegret Wilde (Justus-Liebig-Universität Gießen und Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt. Bei der anschließenden Reinigung wurde der GST-tag abgeschnitten, so dass - wie auch bei den *Synechococcus* Proteinen - vier zusätzliche Reste am N-Terminus verblieben. Auf diese Weise konnten KaiA₆₈₀₃, KaiB1, (KaiB2), KaiB3 und KaiC3 mit guten

Ausbeuten und hoher Reinheit präpariert werden. Die Proteine waren auch nach Lagerung bei -20 °C und mehrmaligem Auftauen und Einfrieren sehr stabil. Nach kurzfristiger Inkubation bei 30 °C konnte keine nennenswerte Degradation beobachtet werden. Rekombinantes KaiC1 hingegen wies nach der Affinitätschromatografie stets eine starke Verunreinigung durch ein Protein mit apparentem Molekulargewicht zwischen 55 und 72 kDa auf. Vermutlich handelte es sich hier um GroEL, da dies bekanntermaßen oftmals mit heterolog in *E.coli* exprimierten Proteinen ko-gereinigt wird [206] und auch häufig in Präparationen von KaiC₇₉₄₂ und KaiC aus *Prochlorococcus marinus* MED4 (KaiC_{MED4}) zu geringem Anteil detektiert wurde. Bei dem Versuch, das ko-gereinigte Protein durch Anionenaustauschchromatografie zu entfernen, ging KaiC1 nahezu vollständig verloren und war auch bereits nach der Affinitätschromatografie derart instabil, dass es innerhalb weniger Stunden degradiert wurde. Auch die Expression mit einem C-terminalen, selbst-schneidenden intein-tag (IMPACT System, New England Biolabs, Frankfurt am Main) oder N-terminalem His-tag (pCOLA-Duet und pACYC-Duet, New England Biolabs, Frankfurt am Main) führte nicht zu ausreichenden Mengen löslichen Proteins. Alternative Ansätze, KaiC1 bei besonders niedrigen Temperaturen zu exprimieren, erbrachten weder bei Verwendung von Expressionsstämmen mit Kälte-adaptierten Chaperonen (GST-Fusionsprotein, *E. coli* Arctic Express (DE3) Zellen, Agilent, Santa Clara, USA) noch bei Expression unter Kontrolle eines kälte-induzierbaren Promotors (His-Fusionsprotein pCOLD System, TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) zufriedenstellende Resultate. Stattdessen wurde für eine initiale Analyse die inhomogene KaiC1-Präparation nach Expression von pGEX-*kaiC1* verwendet (siehe 2.2.2.3).

2.2.2.2 KaiA₆₈₀₃ und KaiB1 können ihre *Synechococcus* Orthologe bezüglich der Regulation der Phosphorylierung von KaiC₇₉₄₂ ersetzen

Um zunächst zu beleuchten ob KaiA₆₈₀₃ und KaiB1 in die Generierung von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungszyklen der KaiC-Proteine aus *Synechocystis* involviert sein könnten, wurde deren Einfluss auf die Phosphorylierung von KaiC₇₉₄₂ mit bekanntermaßen robuster *in vitro* Aktivität untersucht. Analysen zur Aufnahme radioaktiven Phosphats demonstrierten, dass KaiA₆₈₀₃ die Kinase-Aktivität des KaiC₇₉₄₂ in gleichem Maße steigern konnte wie KaiA₇₉₄₂ (Abbildung 2-6.A): Nach Inkubation mit den KaiA-Orthologen in Anwesenheit von [γ -³²P]ATP und anschließender Auftrennung durch SDS-PAGE war die Bande, die phosphoryliertes KaiC₇₉₄₂ repräsentierte, am dominantesten. Zudem nahm das durch Autoradiografie detektierte γ -³²P und somit die Phosphatinkorporation durch KaiC₇₉₄₂ stetig zu. In Abwesenheit von KaiA

wurde dagegen nur eine basale Phosphataufnahme beobachtet und die Menge des phosphorylierten KaiC₇₉₄₂ verringerte sich über die Zeit.

Aus der Literatur ist bekannt, dass KaiC₇₉₄₂ im Rahmen eines Phosphorylierungszyklus nach ca. 16 Stunden nahezu dephosphoryliert vorliegt, weil KaiB₇₉₄₂ der Stimulation der KaiC₇₉₄₂-Phosphorylierung durch KaiA₇₉₄₂ entgegenwirkt [85]. Um zu überprüfen ob KaiB1 ebenfalls als Gegenspieler von KaiA₆₈₀₃ fungieren kann, wurde es für eine Art Momentaufnahme eines potenziellen *in vitro* Phosphorylierungszyklus für 16 Stunden bei 30 °C mit KaiC₇₉₄₂ und KaiA₆₈₀₃ inkubiert (Abbildung 2-6). Tatsächlich dominierte danach die dephosphorylierte Form des KaiC₇₉₄₂, obwohl die alleinige Inkubation von KaiC₇₉₄₂ mit KaiA₆₈₀₃ - in Übereinstimmung mit der obigen Analyse zur Kinase-Aktivität - in der starken Phosphorylierung des KaiC₇₉₄₂ resultierte. KaiB1 konnte somit dem stimulatorischen Einfluss von KaiA₆₈₀₃ entgegenwirken.

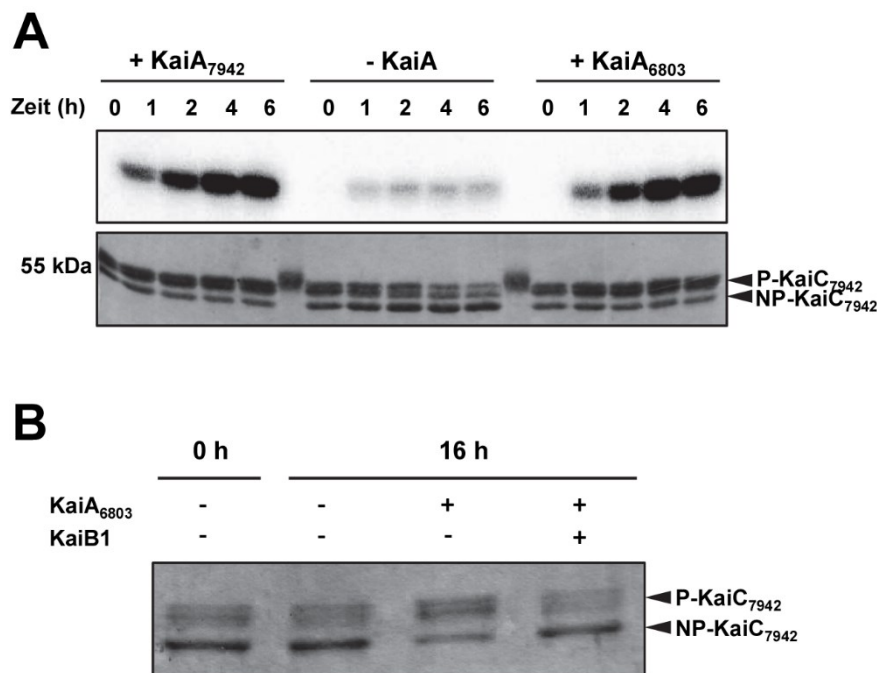


Abbildung 2-6. Untersuchung der Autophosphorylierung von KaiC₇₉₄₂ in Anwesenheit von KaiA₆₈₀₃ und KaiB1. **A.** Die Autokinase-Aktivität des KaiC₇₉₄₂ wurde auch durch KaiA₆₈₀₃ stimuliert. 0,2 µg µl⁻¹ KaiC₇₉₄₂ wurden mit 0,1 µg µl⁻¹ KaiA₇₉₄₂ (+KaiA₇₉₄₂), 0,1 µg µl⁻¹ KaiA₆₈₀₃ (+KaiA₆₈₀₃) oder ohne KaiA (-KaiA) in Anwesenheit von 1,6 µCi [γ-³²P]ATP bei 30 °C inkubiert. Nach 0, 1, 2, 4 und 6 h wurden Aliquots entnommen, eingefroren und anschließend auf ein PAA-Gel (10 % T, 0,67 % C) aufgeladen. Die Proteine wurden nach der elektrophoretischen Separation durch Coomassiefärbung visualisiert (unten) und zudem die Phosphatinkorporation durch Autoradiografie detektiert (oben). **B.** KaiA₆₈₀₃ und KaiB1 konnten ihre *Synechococcus* Orthologe bei der antagonistischen Regulation der Phosphorylierung von KaiC₇₉₄₂ ersetzen. KaiC₇₉₄₂ (0,2 µg µl⁻¹) wurde alleine, nur mit KaiA₆₈₀₃ (0,1 µg µl⁻¹) oder zusätzlich mit KaiB1 (0,05 µg µl⁻¹) bei 30 °C für 16 Stunden inkubiert und die Phosphorylierungsstufen anschließend durch SDS-PAGE (PAA-Gel mit 11 % T, 0,67 % C) aufgetrennt. Als Kontrolle diente ein entsprechender Ansatz ohne KaiA₆₈₀₃ und KaiB1, der während der 16-stündigen Inkubation eingefroren wurde (0 h). Dargestellt ist die Coomassiefärbung der Proteine. (+) und (-) kennzeichnen die An- bzw. Abwesenheit von KaiA₆₈₀₃ und KaiB1. P-KaiC₇₉₄₂: Phosphoryliertes KaiC₇₉₄₂, NP-KaiC₇₉₄₂: nicht-phosphoryliertes KaiC₇₉₄₂.

Das Zusammenspiel von KaiB1 mit KaiC₇₉₄₂ konnte auch durch eine Interaktionsstudie belegt werden (native PAGE, Abbildung 2-7): Nach einwöchiger Inkubation bei 4 °C mit KaiB1 lag der Großteil des hexameren KaiC₇₉₄₂ - analog zur KaiC₇₉₄₂-KaiB₇₉₄₂-Assemblierung - in einem stabilen Komplex mit KaiB1 vor. Vergleichende Analysen mit weiteren KaiB-Homologen zeigten zudem auch eine *in vitro* Interaktion von KaiC₇₉₄₂ mit KaiB3 sowie dem zur Kontrolle analysierten KaiB_{MED4}. Der Anteil an KaiC-KaiB-Komplexen im Verhältnis zu freien KaiC-Hexameren war hier aber deutlich geringer als bei KaiB1 und KaiB₇₉₄₂. Eine Assemblierung von KaiC₇₉₄₂ mit KaiB2 wurde mit dieser Methodik hingegen nicht detektiert.

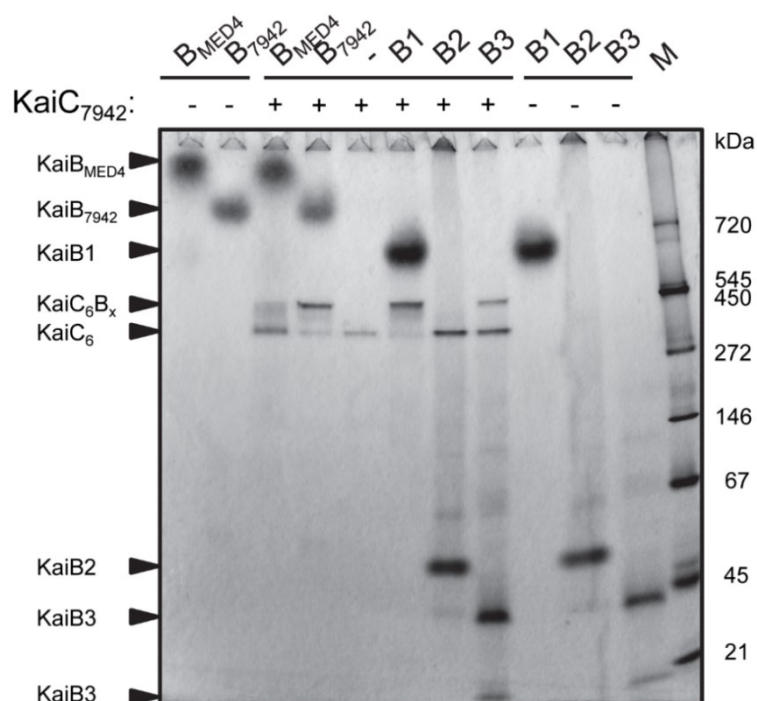


Abbildung 2-7. Analyse der KaiC₇₉₄₂-KaiB-Komplexbildung durch native PAGE - KaiB1 und KaiB3 interagierten mit KaiC₇₉₄₂. 2,86 µM KaiC₇₉₄₂ wurden mit ~ 8,6 µM KaiB1 (B1), KaiB2 (B2), KaiB3 (B3), KaiB₇₉₄₂ (B₇₉₄₂) oder *Prochlorococcus* KaiB (KaiB_{MED4}, B_{MED4}) gemischt und die resultierenden Protein-Komplexe bzw. Proteine nach einwöchiger Inkubation bei 4 °C durch native PAGE separiert und Coomassie gefärbt.

2.2.2.3 KaiC1 besitzt eine durch KaiA stimulierbare Autokinase-Aktivität

Die obigen Substitutionsexperimente bestätigten die Hypothese, dass KaiA₆₈₀₃ und KaiB1 die Phosphorylierung des KaiC1 gegenläufig modulieren könnten. Dies sollte durch vergleichbare *in vitro* Studien mit KaiC1 verifiziert werden. Die Analysen wurden durch die hohe Instabilität des rekombinanten Proteins erschwert, die eine 24-stündige Inkubation nicht erlaubte. Unter Verwendung einer stark verunreinigten KaiC1-Präparation wurde jedoch einmalig sowohl in

Anwesenheit von KaiA₆₈₀₃ als auch bei Inkubation mit dessen *Synechococcus* Ortholog eine Phosphataufnahme durch KaiC1 demonstriert (Abbildung 2-8): Nach einstündiger Inkubation in Anwesenheit von KaiA erschien eine zusätzliche, langsamer migrierende Bande im PAA-Gel. Die Intensität der Bande nahm mit steigender Inkubationszeit zu. In Abwesenheit von KaiA konnte hingegen keine Phosphataufnahme detektiert werden. Zudem migrierte KaiC1 als einzelne Bande im PAA-Gel. Dabei gilt allerdings zu beachten, dass die Menge des eingesetzten KaiC1 im Vergleich zu den Untersuchungen mit KaiC₇₉₄₂ relativ gering war (Vergleiche Abbildung 2-6 und Abbildung 2-8).

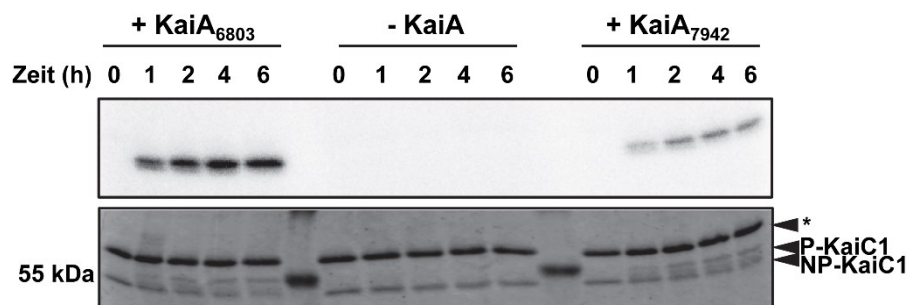


Abbildung 2-8. Analyse der Phosphatinkorporation in KaiC1 - KaiC1 zeigte eine Kinase-Aktivität, die durch KaiA stimuliert wurde. 0,2 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ der inhomogenen KaiC1-Präparation wurden in Abwesenheit (- KaiA) oder Anwesenheit von 0,1 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ KaiA₇₉₄₂ (+ KaiA₇₉₄₂) bzw. KaiA₆₈₀₃ (+ KaiA₆₈₀₃) mit 1,6 $\mu\text{Ci } [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert und die Phosphorylierung zu den angegebenen Zeitpunkten durch SDS-PAGE (PAA-Gel mit 11 % T, 0,67 % C) und anschließende Coomassiefärbung (unten) und Autoradiografie (oben) analysiert. Das Sternchen markiert ein unbekanntes Protein, das stets mit KaiC1 ko-gereinigt wurde. P-KaiC1: Phosphoryliertes KaiC1, NP-KaiC1: nicht-phosphoryliertes KaiC1.

Für eine unabhängige Verifizierung der Autokinase-Aktivität wurde von Anja K. Dörrich homolog in *Synechocystis* exprimiertes KaiC1 zur Verfügung gestellt, das über einen N-terminalen FLAG-tag an Anti-FLAG-Agarose (Sigma Aldrich) gebunden vorlag [183]. Nach Inkubation eines definierten Volumens des an Agarose gekoppelten Proteins mit ca. 0,3 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ KaiA₆₈₀₃ und 1,7 $\mu\text{Ci } [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ wurde erneut ein starker, über die Zeit zunehmender Phosphateinbau beobachtet. In Abwesenheit von KaiA₆₈₀₃ zeigte FLAG-KaiC1 eine basale intrinsische Phosphorylierung (nicht gezeigt). Folglich ist anzunehmen, dass KaiC1 eine mit KaiC₇₉₄₂ vergleichbare Autokinase-Aktivität besitzt, die durch KaiA gesteigert wird.

2.2.2.4 KaiC3 zeigt eine von KaiA unabhängige Kinase-Aktivität

Untersuchungen zur Phosphataufnahme von KaiC3 durch Inkubation mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ belegten, dass dieses divergierte KaiC-Homolog bei 30 °C ebenfalls eine intrinsische Kinase-Aktivität aufweist. In Übereinstimmung mit den theoretischen Vorhersagen (2.2.1) erfolgte die

Phosphatinkorporation jedoch unabhängig von KaiA (exemplarisch gezeigt in Abbildung 2-9.A,B). Selbst bei Erhöhung des KaiA:KaiC3-Verhältnisses auf bis zu 2:1 (bezogen auf die Masse) wurde die Phosphorylierung nicht gesteigert (nicht gezeigt).

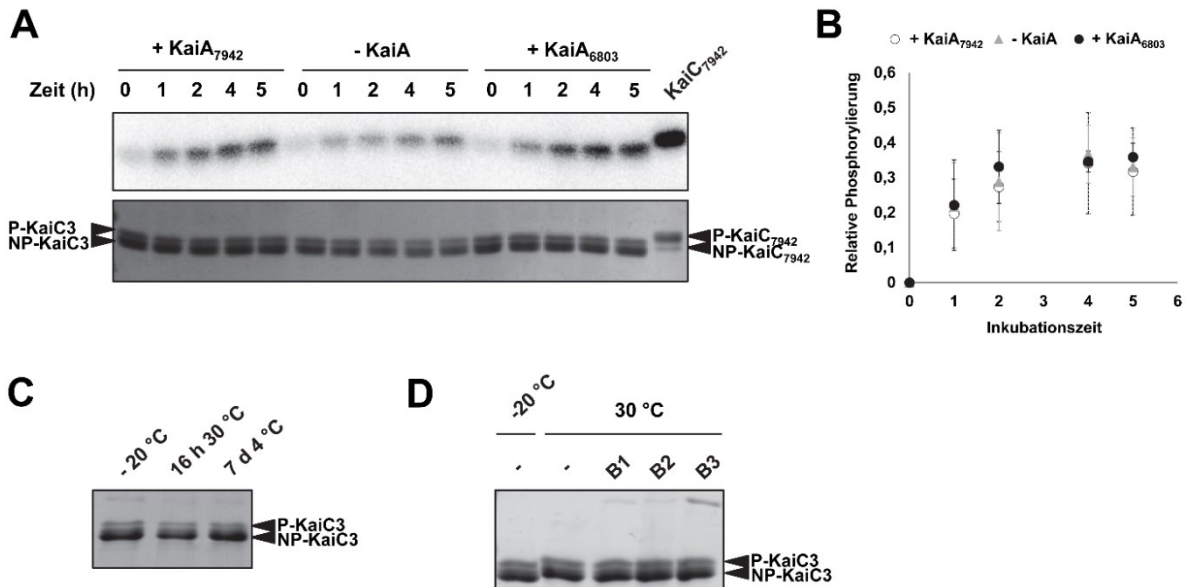


Abbildung 2-9. Untersuchung der Phosphorylierung von KaiC3. - **A,B. KaiC3 inkorporierte unabhängig von KaiA Phosphat.** 0,2 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ KaiC3 wurden in Anwesenheit von 0,1 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ KaiA₇₉₄₂ (+KaiA₇₉₄₂), 0,1 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ KaiA₆₈₀₃ (+KaiA₆₈₀₃) bzw. ohne KaiA (-KaiA) mit 1,6 $\mu\text{Ci } [\gamma^{32}\text{-P}]\text{ATP}$ für 0-5 Stunden bei 30 °C inkubiert und die Proteine durch SDS-PAGE (PAA-Gel mit 10 % T, 0,67 % C) separiert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge KaiC₇₉₄₂ zeitgleich für fünf Stunden mit KaiA₇₉₄₂ inkubiert und aufgetrennt. In **A** sind die Coomassiefärbung der Proteine (unten) und Autoradiografie (oben) einer exemplarischen Analyse dargestellt. In **B** ist diese relative Phosphorylierung des KaiC3 in Bezug auf KaiC₇₉₄₂ als „Mittelwert“ aus zwei Analysen inkl. „Standardabweichung“ dargestellt. Der Mittelwert aller drei Inkubationsvarianten (mit und ohne KaiA-Orthologe) lag nach fünfstündiger Inkubation bei $0,34 \pm 0,07$. **C. Niedrige Temperaturen hatten keinen Einfluss auf die Phosphorylierung.** 0,5 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ KaiC3 wurden für 16 Stunden bei 30 °C sowie für 7 Tage bei 4 °C, jeweils mit 1mM ATP, inkubiert und im Vergleich mit dem unbehandelten Protein (-20 °C) in einem PAA-Gel (11 % T, 0,67 % C) aufgetrennt. Gezeigt sind die Coomassie-gefärbten Proteine. **D. Die Verteilung der Phosphorylierungsformen blieb auch in Anwesenheit von KaiB gleich** 0,17 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ KaiC3 wurden mit 2 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ KaiB1, KaiB2, KaiB3 oder ohne KaiB gemischt und nach 16-stündiger Inkubation bei 30 °C durch SDS-PAGE (PAA-Gel mit 11 % T, 0,67 % C) mit anschließender Coomassiefärbung analysiert. Als Kontrolle diente ein entsprechender Ansatz ohne KaiB, der bei -20 °C gelagert wurde. P-KaiC3: Phosphoryliertes KaiC3, NP-KaiC3: nicht-phosphoryliertes KaiC3.

Zur Gegenüberstellung wurde rekombinantes KaiC₇₉₄₂, das zuvor fünf Stunden in Anwesenheit von KaiA₇₉₄₂ und $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert worden war, im gleichen PAA-Gel aufgetrennt und das autoradiografische Signal mit den Signalen verglichen, die aus der Phosphatinkorporation in KaiC3 resultierten. Ungeachtet der Anwesenheit von KaiA hatte KaiC3 nach fünfstündiger Inkubation bei 30 °C nur etwa ein Drittel des an KaiC₇₉₄₂ detektierten $\gamma^{32}\text{P}$ eingebaut (Abbildung 2-9.B). Im Vergleich zur basalen KaiC₇₉₄₂-Aktivität in Abwesenheit von KaiA betrug die Phosphataufnahme aber dennoch fast das Dreifache. KaiC3 wurde elektrophoretisch in 2-3 Banden getrennt (Abbildung 2-9.A). Obwohl das Signal des gebundenen $\gamma^{32}\text{P}$ stetig

anstieg, wurde keine nennenswerte Zu- oder Abnahme der oberen bzw. unteren KaiC3-Bande(n) beobachtet.

Das Bandenmuster erschien auch nach verlängerter Inkubation (16 h) mit 1 mM ATP bei 30 °C nicht verändert und blieb selbst nach einwöchiger Inkubation bei 4 °C annähernd gleich (Abbildung 2-9.C). Um einen potenziellen Einfluss der KaiB-Proteine auf die KaiC3-Phosphorylierung zu analysieren, wurde KaiC3 zudem für 16 h bei 30 °C mit 1 mM ATP und einem Überschuss an KaiB1, KaiB2 oder KaiB3 inkubiert. Auch hier zeigte sich keine Veränderung im Vergleich zu KaiC3, das ohne KaiB inkubiert bzw. bei -20 °C gelagert wurde (Abbildung 2-9.D).

Der dephosphorylierte Zustand von S431 und T432 kann in KaiC₇₉₄₂ durch die Substitution mit Alanin annähernd imitiert werden [85,87]. Durch das Ersetzen der Phosphorylierungsstellen mit den geladenen Aminosäuren Glutamat und/oder Aspartat wird der phosphorylierte Zustand des KaiC₇₉₄₂ nachgeahmt [85,99]. In Anlehnung daran wurden zwei KaiC3-Varianten durch ortsgerichtete Mutagenese generiert, in denen die Reste S423 und T424, welche homolog zu T431 und S432 in KaiC₇₉₄₂ sind, gegen Alanin (KaiC3-AA) bzw. gegen Aspartat und Glutamat (KaiC3-DE) ausgetauscht wurden. Die Varianten konnten unter den für das Wildtyp-Protein etablierten Bedingungen exprimiert und mit guter Ausbeute zu hoher Homogenität gereinigt werden. Um die Identität der unterschiedlich weit im Gel migrierenden Banden des KaiC3 aufzuklären, wurden KaiC3, KaiC3-AA und KaiC3-DE durch Elektrophorese in einem niedrigvernetzten PAA-Gel mit längerer Laufstrecke (ca. 15 cm) weiter aufgetrennt (Abbildung 2-10). Bei KaiC3 wurden abermals zwei dominante, distinkte Banden separiert, zwischen denen sich 1-2 zusätzliche, verschwommene Banden befanden. Erneut war das Bandenmuster nach Inkubation bei 30 °C im Vergleich zum Protein, das bei -20 °C gelagert wurde, unverändert. Die langsamer migrierenden Banden verschwanden nach Behandlung mit einer Lambda-Protein-Phosphatase (New England Biolabs, Frankfurt am Main), welche Serin-, Threonin- und Tyrosin-gebundene Phosphatgruppen abspalten kann, nahezu vollständig. Bei Inkubation mit der Lambda-Protein-Phosphatase in Anwesenheit eines Phosphatase-Inhibitor-Cocktails (Roche, Berlin) blieb das Bandenprofil hingegen nahezu erhalten. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die schneller laufende Bande vollständig dephosphoryliertes KaiC3 und die darüber liegenden Banden phosphoryliertes KaiC3 repräsentierten. KaiC3-AA und KaiC3-DE formten sowohl in An- als auch Abwesenheit der Lambda-Protein-Phosphatase nur eine distinkte Bande und wiesen folglich keine Phosphorylierung auf. KaiC3-AA migrierte dabei

auf gleicher Höhe wie die dephosphorylierte Form des KaiC3. KaiC3-DE zeigte ein apparentes Molekulargewicht, das zwischen dem der beiden dominantesten KaiC3-Phosphorylierungsformen lag.

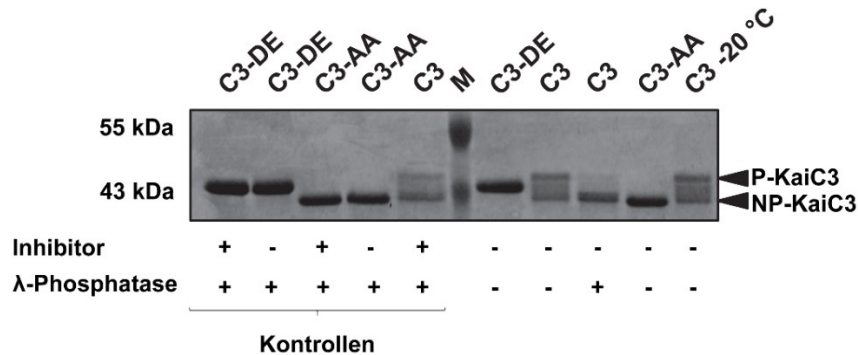


Abbildung 2-10. Zuordnung der Phosphorylierungsformen von KaiC3 – Nicht phosphoryliertes KaiC3 (NP-KaiC3) migriert weiter als phosphoryliertes KaiC3 (P-KaiC3). Je 15 µg KaiC3 (C3), KaiC3-AA (C3-AA) und KaiC3-DE (C3-DE) wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte ohne Zusatz, mit 100 U Lambda-Protein-Phosphatase pro Mikrogramm Protein in Anwesenheit eines Phosphatase-Inhibitors oder mit Lambda-Protein-Phosphatase in Abwesenheit eines Phosphatase-Inhibitors. Anschließend wurden die Proteine aus den verschiedenen Reaktionsansätzen im Vergleich zu unbehandeltem KaiC3-Protein (C3 -20 °C) in einem PAA-Gel mit 11% T, 0,67 C elektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist die Coomassiefärbung der Proteine. Die Zugabe von Lambda-Protein-Phosphatase (λ-Phosphatase) und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (Inhibitor) ist durch ein +, deren Abwesenheit durch ein – angegeben. P-KaiC3: Phosphoryliertes KaiC3, NP-KaiC3: nicht-phosphoryliertes KaiC3.

2.2.2.5 KaiC3 synthetisiert ATP

Die Dephosphorylierung des KaiC₇₉₄₂ erfolgt als zweistufiger Prozess: Die an den Phosphorylierungsstellen gebundenen Phosphatgruppen werden zunächst auf ADP übertragen, wodurch ATP als Intermediat entsteht, welches dann anschließend hydrolysiert wird [78,79] (Siehe auch 1.3.2.2.). Da KaiC3 eine intrinsische Phosphorylierung zeigte, sollte anhand der Bildung von ATP überprüft werden ob es – wie vorhergesagt (2.2.1) – auch zur Autodephosphorylierung fähig ist. Zum Vergleich diente KaiC₇₉₄₂ mit hohem und niedrigem Phosphorylierungsgrad, der durch vorherige Inkubation für zwei Wochen bei 4 °C bzw. 16-stündige Inkubation bei 30 °C erzeugt wurde (Abbildung 2-11.C, vgl. auch Abschnitt 2.1). Die Proteine wurden jeweils bei Raumtemperatur mit [α-³²P]ADP gemischt, einmal bei -20 °C gelagert und einmal bei 30 °C für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden Aliquots auf eine Cellulose-Platte aufgetragen, die enthaltenen Nukleotide mittels Dünnschichtchromatografie aufgetrennt und der relative Anteil des gebildeten [α-³²P]ATPs durch Autoradiografie ermittelt.

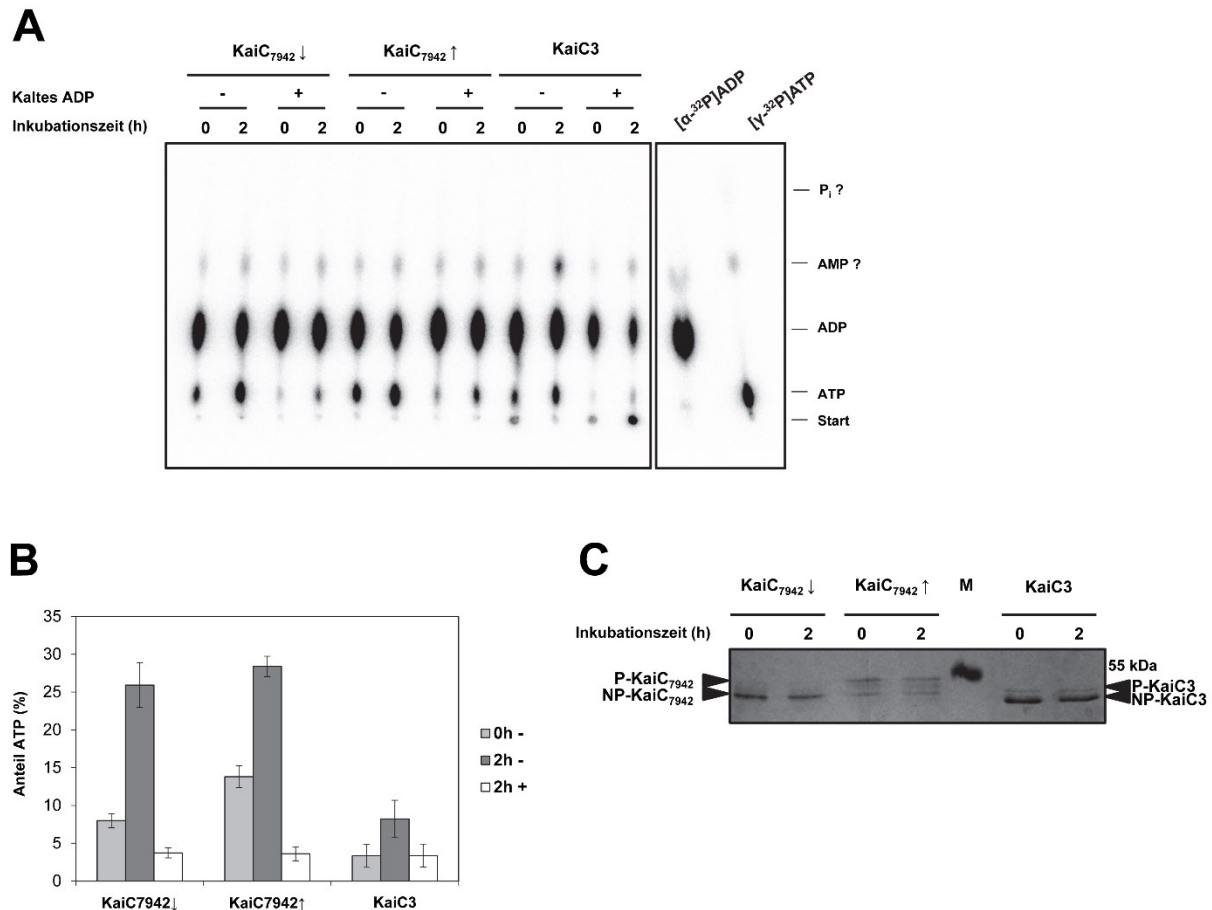


Abbildung 2-11. Analyse der Bildung [α-³²P]ATPs durch Dünnschichtchromatografie. A,B. KaiC3 zeigte eine basale ATP-Synthase-Aktivität. 3 μM KaiC3 sowie phosphoryliertes (KaiC₇₉₄₂↑) und dephosphoryliertes (KaiC₇₉₄₂↓) KaiC₇₉₄₂ wurden in Anwesenheit von 0,5 mM ATP mit 0,27 μM [α-³²P]ADP versetzt und bei -20 °C gelagert (0) oder für zwei Stunden bei 30 °C (2) inkubiert. Anschließend wurden Aliquots der entstehenden Nukleotide im Vergleich zu [α-³²P]ADP und [γ-³²P]ATP durch Dünnschichtchromatografie aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz mit Überschuss (0,5 mM) an nicht-radioaktivem ADP (Kaltes ADP) mitgeführt. Die Detektion von [³²P] erfolgte durch Autoradiografie. Zur Berechnung des relativen Anteils an gebildetem [α-³²P]ATP wurde jeweils die Signalintensität des entsprechenden Spots durch die Signalintensität aller [³²P]Nukleotid-Spots (Start, [α-³²P]ATP, [α-³²P]ADP, [α-³²P]AMP) geteilt. Der relative ATP-Anteil in den Proben mit Überschuss an nicht-radioaktivem ADP, der unmittelbar nach dem Mischen detektiert wurde (0), wurde als Hintergrund abgezogen. Dargestellt sind eine exemplarische Analyse (A) sowie die Mittelwerte und Standardabweichung von insgesamt 4 Dünnschichtchromatografien nach zwei Inkubationen (B). C. **Phosphorylierung der verwendeten Proteine.** Die zur Untersuchung der ATP-Synthase eingesetzten Proteine wurden parallel ohne [α-³²P]ADP für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert (2) bzw. nach dem Mischen bei -20 °C gelagert (0) und die Phosphorylierung durch SDS-PAGE (PAA-Gel mit 11 % T, 0,67 % C) und Coomassiefärbung analysiert.

Abbildung 2-11.A veranschaulicht, dass bei allen drei Proteinen bereits unmittelbar nach Zugabe von [α-³²P]ADP (0 h) radioaktiv markiertes ATP gebildet wurde. In ansonsten gleichen Ansätzen, die mit einem mehr als 1850-fachen Überschuss an nicht-radioaktivem ADP (bezogen auf [α-³²P]ADP) versetzt worden waren, war die initiale Bildung des [α-³²P]ATPs minimal. Das relative ATP-Signal in diesen Proben wurde bei der Berechnung des in Abbildung 2-11.B dargestellten relativen ATP-Anteils als Hintergrund abgezogen.

Unmittelbar nach dem Mischen wurde in Anwesenheit des phosphorylierten KaiC₇₉₄₂ ein relativer ATP-Gehalt von ca. 14 % detektiert. Von dem dephosphorylierten KaiC₇₉₄₂ wurde initial nur halb so viel ATP, aber dennoch fast die dreifache Menge des durch KaiC3 synthetisierten ATP gebildet. Nach zweistündiger Inkubation bei 30 °C stieg der ATP-Gehalt in Anwesenheit von dephosphoryliertem KaiC₇₉₄₂ etwas stärker an als bei phosphoryliertem KaiC₇₉₄₂, wodurch ein vergleichbarer relativer ATP-Anteil von ca. 26 % bzw. 28 % erreicht wurde. Auch durch KaiC3 wurde eindeutig ATP synthetisiert. Der relative ATP-Gehalt nach zweistündiger Inkubation betrug aber nur ca. 8 %. Zudem war die Zunahme nach der initialen ATP-Synthese nur geringfügig größer als bei der zweistündigen Inkubation mit einem Überschuss an kaltem ADP. Folglich konnte eine sehr schwache ATP-Synthase- bzw. Phosphotransferase-Aktivität für KaiC3 nachgewiesen werden.

2.2.2.6 KaiC3 besitzt eine ATPase-Aktivität

Neben der Fähigkeit zur intrinsischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung, welche die ATP-Synthese und -Hydrolyse am CII-Ring mit einschließt, wurde eine ATPase-Aktivität in der CI-Hälfte des KaiC3 vorhergesagt (2.2.1). Mithilfe des Malachitgrün-Assays, der die kalorimetrische Bestimmung anorganischen Phosphats erlaubt, sollte darum überprüft werden ob KaiC3 tatsächlich ATP-Hydrolyse katalysiert.

Das Protein wurde für 0 und 24 Stunden mit 1 mM ATP inkubiert, die in den Ansätzen vorhandene Menge anorganischen Phosphats detektiert und anhand der Differenz die ATP-Menge pro KaiC-Monomer berechnet, die an einem Tag hydrolysiert wurde. Dabei wurde auch die geringfügige Autohydrolyse von ATP, die in Kontrollansätzen ohne Protein ermittelt wurde, abgezogen. In acht bis zwölf Wiederholungen wurden Werte ermittelt, die, wie die Box-Whisker-Plots in Abbildung 2-12 veranschaulichen, sehr hohe Abweichungen aufwiesen. Für KaiC₇₉₄₂ wurde ein ATP-Umsatz von $22,2 \pm 8,4$ ATP pro Monomer und Tag gemessen. Die in Abbildung 2-12 eingezeichneten Mediane sowie auch die Mittelwerte der Messungen suggerierten zunächst, dass KaiC3, KaiC3-AA und KaiC3-DE pro Tag mehr ATP umsetzten (ca. 28-35 ATP pro Monomer und Tag (Mittelwerte)) als KaiC₇₉₄₂ (ca. 22 ATP pro Monomer und Tag (Mittelwert)). Der beim Betrachten der großen Spannweite entstehende Eindruck, dass sich die Stichproben nicht signifikant voneinander unterschieden, wurde aber durch eine einfaktorielle Varianzanalyse bestätigt. Der ATP-Umsatz von KaiC3 und dessen Varianten konnte anhand der hier durchgeführten Analyse daher nicht verlässlich beziffert werden.

Dennoch scheint eindeutig, dass sowohl KaiC3 als auch KaiC3-AA und KaiC3-DE ATP hydrolysieren, wobei der Umsatz in der Größenordnung desjenigen von KaiC₇₉₄₂ liegt.

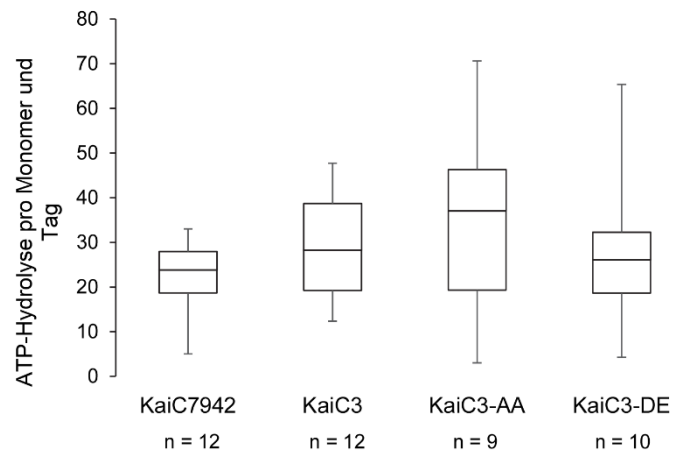


Abbildung 2-12. Bestimmung freigesetzten Phosphats - KaiC3, KaiC3-AA und KaiC3-DE zeigten eine ATPase-Aktivität. KaiC3, KaiC3-AA, KaiC3-DE und KaiC₇₉₄₂ wurden für 24 Stunden mit 1 mM ATP bei 30 °C inkubiert und anschließend mithilfe eines Malachitgrün-Assays die Menge hydrolysierten ATPs über die Freisetzung anorganischen Phosphats bestimmt. Jede Bestimmung erfolgte als technische Dreifachbestimmung. Bereits zur Stunde null in den Proben enthaltenes Phosphat sowie Phosphat, das durch ATP-Autohydrolyse entstand, wurde abgezogen. Der Box-Whisker-Plot fasst die ATP-Hydrolyseraten zusammen, die in 8-12 Messungen (n) ermittelt wurden. Die Boxen stellen den Interquartilsabstand zwischen 1. und 3. Quartil, die Whisker die Spannweite zwischen den minimalen und maximalen Werten dar. Zudem ist in den Boxen der Median eingezeichnet.

2.2.3 *In vivo* Verhalten der multiplen Kai-Proteine in *Synechocystis*

Nachdem erfolgreich belegt war, dass sowohl KaiC1 als auch KaiC3 *in vitro* Enzymaktivitäten aufweisen, sollte das zelluläre Verhalten der Kai-Proteine im Zusammenhang mit einer zeitlichen Koordination aufgeklärt werden.

Dabei kamen *kaiABC*- und *kaiC3*-Deletionsmutanten von *Synechocystis* zum Einsatz, die von Anja K. Dörrich aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Annegret Wilde (Justus-Liebig-Universität Gießen und Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) generiert wurden [207]. Zudem wurde ein Gesamtzellextrakt aus einer bislang unveröffentlichten Mutante verwendet, in der KaiC2 und KaiB2 überexprimiert vorliegen (*Synechocystis kaiC2B2* Überexpressor). Der Extrakt wurde ebenfalls von Anja K. Dörrich zur Verfügung gestellt.

2.2.3.1 Kultivierung von *Synechocystis* unter diurnalen und circadianen Bedingungen

Um zunächst das zeitliche Verhalten von *Synechocystis* im Allgemeinen zu beleuchten, wurden jeweils vier Replikate des Wildtyps unter drei verschiedenen Lichtbedingungen angezogen und über 48 Stunden Proben zur Analyse unterschiedlicher Parameter entnommen (Abbildung 2-13.A). In einem ersten Experiment wurden die Zellen nach dreitägiger Synchronisierung in LD weiter in diesem Zyklus kultiviert (LDLD). In einem zweiten und dritten Experiment wurden sie hingegen nach der ersten Nacht, die sich an die dreitägige Synchronisierung anschloss, in kontinuierliches Licht (LDLL) bzw. Dauerdunkel (LDDD) überführt. An der Kultivierung, Probennahme, Zellzahlbestimmung und den Absorptionsmessungen (s. u.) waren neben mir, Dr. Anne Rediger, Christian Beck, Dr. Stefanie Hertel, Dr. Reimo Zoschke, und Dr. Michi Tillich beteiligt.

Synechocystis kann bei photoautotrophem Wachstum unter idealen Bedingungen Verdopplungszeiten von nur sieben Stunden erreichen [189,208]. Eine Wachstumsoptimierung wird insbesondere durch Anpassung der Lichtintensitäten, der Temperatur und des pH-Werts [209] oder aber eine kontinuierliche Kultivierung erreicht. Um Einflüsse auf das temporäre Verhalten durch periodische Verdünnungen zu vermeiden, erfolgte die Anzucht hier jedoch im *batch*-Verfahren. Dabei wurde das Wachstum gezielt so gering gehalten, dass während der 48-stündigen Probennahmen keine Zelldichten erreicht wurden, die den Übertritt in eine andere Wachstumsphase und damit einhergehende Veränderungen der Genexpression [210], auslösen würden. Lange Verdopplungszeiten wurden zudem aufgrund der Annahme favorisiert, dass sehr hohe Wachstumsraten vermutlich nur unter artifiziellen Laborbedingungen, nicht aber in natürlichen Habitaten erreicht werden können.

Unter allen Bedingungen wiesen die Zellen aufgrund der geringen Belichtungsstärke eine eher geringe Teilungsrate auf (Abbildung 2-13.B). Über die 48 Stunden der Probennahme erhöhte sich die optische Dichte bei 750 nm (OD_{750nm}) nur um ca. 60 % (LDLD), 40 % (LDLL) bzw. 10 % (LDDD). Unter der vereinfachten Annahme eines durchgehend exponentiellen Wachstums ließ sich eine Verdopplungszeit von ca. 80 (LDLD), 130 (LDLL) bzw. 170 (LDDD) Stunden berechnen. Das Wachstum in LDLD erfolgte allerdings treppenförmig: Während der Lichtphase stieg die OD_{750nm} deutlich, in den Dunkelphasen war indes nur ein minimales Wachstum zu verzeichnen. Dementsprechend wuchsen die Zellpopulationen nach Überführung in LL stetig weiter, wohingegen nach Überführung in DD kaum noch Zellteilung beobachtet wurde. Bei einem der vier in LDDD kultivierten Replikate wurde sogar eine Abnahme der

OD_{750nm} gemessen. Dieses Replikat wurde darum für die nachfolgenden Betrachtungen nicht verwendet und aus der in Abbildung 2-13.B dargestellten Wachstumskurve herausgenommen. Während dieser sowie weiterer Kultivierungen von *Synechocystis* wurden exemplarisch zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen gezählt und basierend darauf ein mittlerer Faktor für die Umrechnung der OD_{750nm} in die Zellzahl ermittelt (OD_{750nm} von 1 = $7,85 \pm 1,97 \times 10^7$ Zellen). Potenzielle temporäre Veränderungen der Korrelation von Zellzahl und OD_{750nm}, die z.B. aufgrund variierender Zellgrößen zustande kommen können, wurden dabei ignoriert.

Um den physiologischen Zustand der Zellen zu charakterisieren, wurden Absorptionsspektren ganzer Zellen im Bereich von 400 bis 750 nm aufgenommen. Wie in Abbildung 2-13.C exemplarisch für drei Zeitpunkte dargestellt, erfolgte unter keiner der gewählten Lichtbedingungen eine nennenswerte Veränderung der Absorption von Phycocyanin, Chlorophyll a oder den Carotinoiden. Um dies für jeden der analysierten Zeitpunkte darzustellen, wurde aus den Absorptionsspektren das Verhältnis des Phycocyanin- zu Chlorophyll-Gehalts nach Myers [211] berechnet und in Abbildung 2-13.D gegen die Zeit aufgetragen (weiße Symbole). Unter allen drei Lichtbedingungen zeigten sich vergleichbare mittlere Werte (horizontale unterbrochene Linie in Abbildung 2-13.D). Die Diagramme suggerieren zwar zunächst eine geringfügige Abnahme des Verhältnisses von Phycocyanin zu Chlorophyll in der Nacht, laut einer einfaktoriellen Varianzanalyse unterschieden sich die ermittelten Werte jedoch mit mehr als fünfprozentiger Wahrscheinlichkeit nicht voneinander. Folglich müssen die Änderungen als nicht signifikant betrachtet werden. Stattdessen ist davon auszugehen, dass keine Anpassung des Pigmentgehalts als kurzfristige Antwort auf die Lichtwechsel bzw. dauerhafte Anpassung an die veränderten Lichtbedingungen erfolgte.

Neben den Untersuchungen zum Pigmentgehalt wurde auch die Gesamtproteinmenge pro Zelle bestimmt. Im Mittel aller Zeitpunkte lag die Konzentration unter allen drei Bedingungen auf einem vergleichbaren Niveau von $2,65 \pm 0,12$ pg pro Zelle (LDLD), $2,27 \pm 0,07$ pg pro Zelle (LDLL) bzw. $2,74 \pm 0,12$ pg pro Zelle (LDDD). Erneut war keine signifikante Veränderung über die Zeit detektierbar. Bei einer einfaktoriellen Varianzanalyse lag die Wahrscheinlichkeit, dass nur zufällige Unterschiede gemessen wurden, jeweils über fünf Prozent.

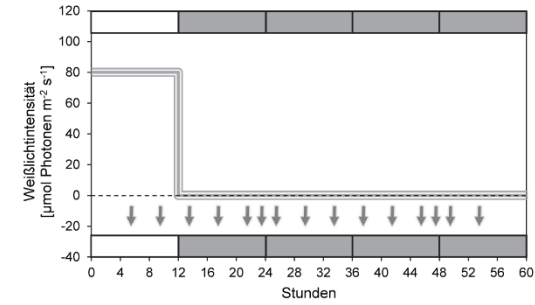
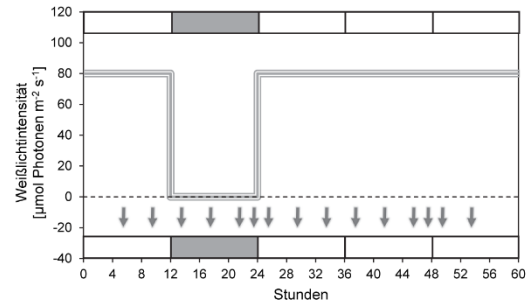
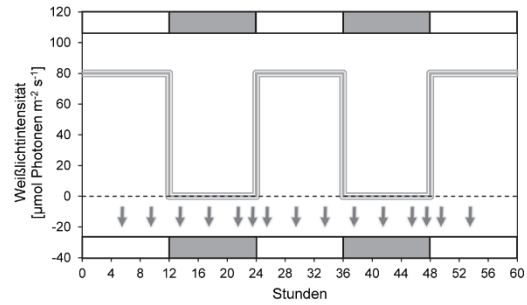
LDLD

LDLL

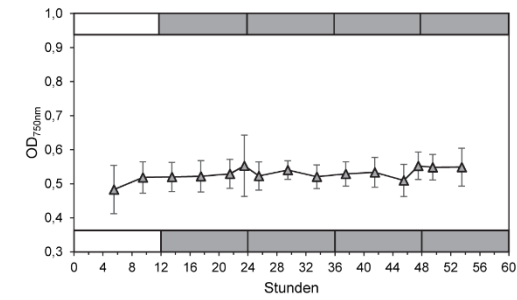
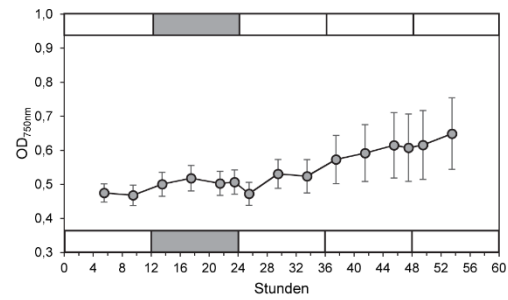
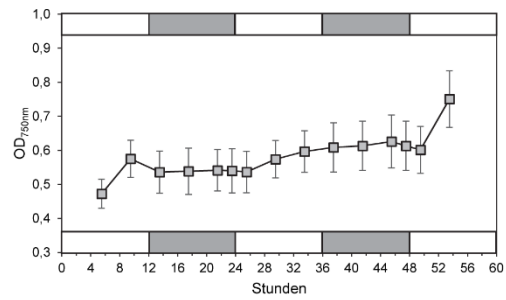
LDDD

Ergebnisse

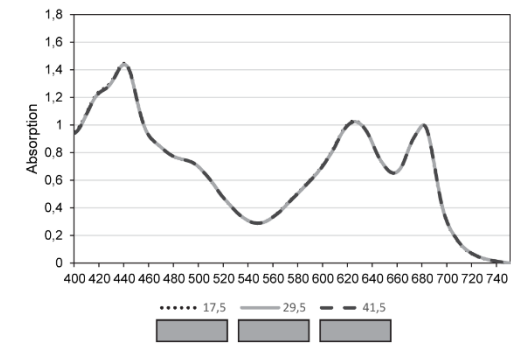
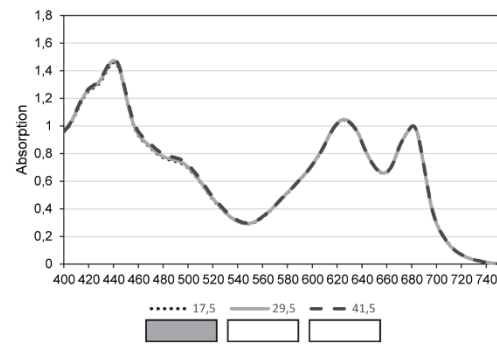
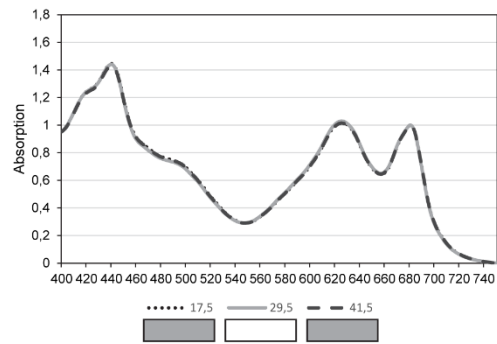
A



B



C



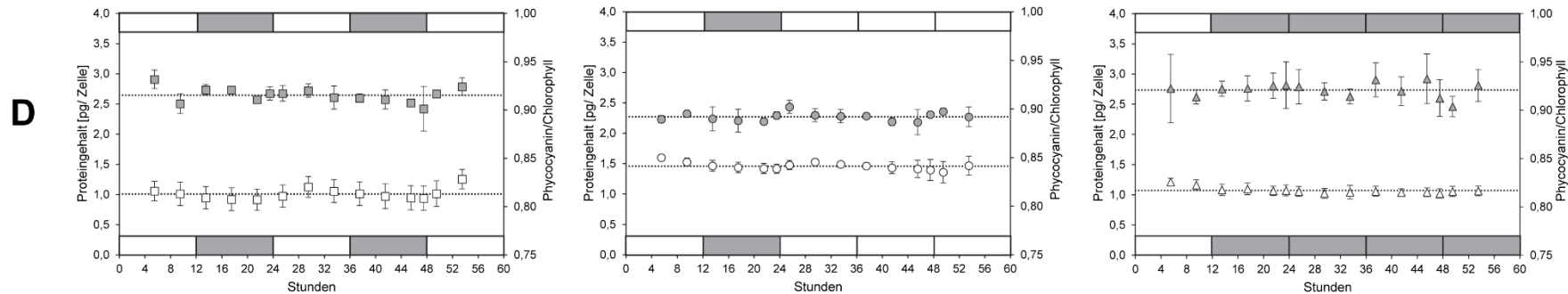


Abbildung 2-13. Zeitliche Beschreibung physiologischer Parameter unter diurnalen und circadianen Bedingungen A. 48-stündige Probennahme unter drei verschiedenen Lichtbedingungen Zur Analyse des temporären Verhaltens verschiedener Parameter unter unterschiedlichen Lichtbedingungen wurden drei unabhängige Experimente mit jeweils vier LD-synchronisierten *Synechocystis*-Kulturen durchgeführt. Im ersten Experiment wurden die Zellen weiter in einem Rhythmus aus zwölfstündiger Belichtung mit $80 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (weiße Balken) und zwölfstündiger Dunkelheit (graue Balken) kultiviert (LDLD, linke Spalte). In einem zweiten Experiment wurden die Zellen nach der ersten Nacht, die sich an die dreitägige Synchronisierung anschloss, in kontinuierliche Belichtung (LDLL, mittlere Spalte), in einem dritten Experiment in kontinuierliche Dunkelheit (LDDD, rechte Spalte) überführt. Zu den durch die Pfeile markierten Zeitpunkten wurden, beginnend mit ZT 5,5, über 48 Stunden Proben für weiterführende Analysen entnommen. **B. In den Lichtphasen zeigten die Zellpopulationen ein stetiges, in den Dunkelphasen nur ein geringfügiges Wachstum.** Dargestellt sind die Mittelwerte der $\text{OD}_{750\text{nm}}$ mit Standardabweichung von 4 Replikaten (LDLD & LDLL) bzw. 3 biologischen Replikaten (LDDD) **C. Die Absorptionsspektren ganzer Zellen blieben über die Zeit unverändert.** Die Abbildung zeigt jeweils exemplarische Absorptionsspektren zur Stunde 17,5, 29,5 und 41,5 im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 750 nm nach Normalisierung auf die $\text{OD}_{750\text{nm}}$ und den Chlorophyll a Peak bei $\sim 680 \text{ nm}$. Bei $\sim 625 \text{ nm}$ ist das Absorptionsmaximum des Phycocyanin zu sehen. **D. Das Verhältnis des Phycocyanin- zu Chlorophyllgehalts sowie die Gesamtproteinmenge pro Zelle blieben jeweils nahezu konstant.** Das Verhältnis von Phycocyanin zu Chlorophyll, berechnet nach Myers, ist mit weißen Symbolen, der Gesamtproteingehalt pro Zelle mit grauen Symbolen dargestellt. Aufgrund technischer Fehler bei der Aufnahme des Absorptionsspektrums wurde das Verhältnis von Phycocyanin zu Chlorophyll nach 23,5 Stunden bei der LDLD-Reihe nicht berechnet. Die Werte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichung von vier (LDLD & LDLL) bzw. drei biologischen Replikaten (LDDD). Die unterbrochenen horizontalen Linien markieren jeweils den Mittelwert der zu allen Zeitpunkten ermittelten Werte. Dunkelphasen bei der Kultivierung sind durch einen grauen, Lichtphasen durch einen weißen Balken symbolisiert.

Im Rahmen der hier dargestellten Experimente wurden Proben entnommen, die für intensive Studien der RNA-Abundanz sowie die Analyse zeitlicher Veränderungen auf Transkriptebene dienten. Die gewonnenen Resultate wurden zusammen mit Teilen der hier beschriebenen physiologischen Daten in AEM veröffentlicht [212] und werden im Zusammenhang mit den nachfolgend beschriebenen Analysen in Abschnitt 3.2.3. diskutiert. Hier soll nun auf Studien zum Verhalten der Kai-Proteine eingegangen werden.

2.2.3.2 Generierung spezifischer Antikörper

Um die zeitliche und räumliche Akkumulation der divergierten Kai-Proteine aus *Synechocystis* untersuchen zu können, wurde die Generierung von Antikörpern durch die Firma *Pineda Antikörper-Service* in Auftrag gegeben (4.2.3.14). Zur Bildung eines gegen KaiA₆₈₀₃ gerichteten Antikörpers wurde denaturiertes rekombinantes KaiA₆₈₀₃ (siehe auch Abschnitt 2.2.2.1) zur Immunisierung von zwei Kaninchen an die beauftragte Firma weiter gereicht. Zum Zwecke der Generierung von Antiseren, die jeweils spezifisch nur eines der KaiB- und KaiC-Proteine detektieren, wurden synthetische Peptide eingesetzt (Tabelle 4-7). Die Antikörperproduktion wurde durch Westernblot-Analysen mit *Synechocystis* Gesamtzellextrakten überprüft und anhand dessen der Zeitpunkt der Serumgewinnung sowie das jeweils besser geeignete Versuchstier ausgewählt. Bei einer Westernblot-Analyse nach vergleichender Auftrennung von Gesamtzellextrakten aus *Synechocystis* Wildtyp, *Synechocystis* $\Delta kaiABC$, *Synechocystis* $\Delta kaiC3$ sowie dem *Synechocystis* *kaiC2B2* Überexpressor wurden KaiA₆₈₀₃ und KaiC1 von dem α -KaiA⁵- bzw. α -KaiC1-Antikörper spezifisch erkannt (Abbildung 2-14): Auf Höhe der theoretisch berechneten Molekulargewichte von KaiA₆₈₀₃ bzw. KaiC1 waren im *Synechocystis* Wildtyp, nicht aber in der entsprechenden Deletionsmutante, distinkte Banden zu sehen. Nach der analogen Immuno-Detektion unter Verwendung des α -KaiC3-Antikörpers wurde im *Synechocystis* Wildtyp-Extrakt ebenfalls eine starke Proteinbande mit dem zu erwartenden apparenten Molekulargewicht detektiert. Eine äußerst schwache Bindung des Antikörpers an KaiC1, KaiC2 oder ein anderes Protein mit vergleichbarer Größe konnte hier nicht gänzlich ausgeschlossen werden, weil sich auf gleicher Höhe auch im Gesamtzellextrakt von *Synechocystis* $\Delta kaiC3$ ein Signal mit verschwindend geringer Intensität zeigte. Aufgrund der schwachen Ausprägung dieses Signals wurde der

⁵ Da der gegen rekombinantes KaiA₆₈₀₃ gerichtete Antikörper sowohl an KaiA₆₈₀₃ als auch KaiA₇₉₄₂ bindet (nicht gezeigt), wird er im Folgenden allgemein als α -KaiA-Antikörper bezeichnet.

Antikörper aber dennoch als spezifisch für KaiC3 deklariert. Der α -KaiC2-Antikörper detektierte zwei Proteine ähnlicher Größe im *Synechocystis* Wildtyp. Die untere Proteinbande war im Gesamtzellextrakt des *Synechocystis kaiC2B2* Überexpressors deutlich abundanter, weswegen davon auszugehen ist, dass es sich bei der darüber liegenden Bande um ein anderes Protein handelte. Die Spezifität des α -KaiC2-Antikörpers konnte mangels einer *kaiC2B2*-Deletionsmutante nicht eindeutig belegt werden. Da die durch den α -KaiC2-Antikörper detektierten Proteine aber etwas langsamer migrierten, als KaiC1 und KaiC3-Antikörper war eine Bindung an diese KaiC-Homologe unwahrscheinlich (nicht gezeigt). Insgesamt wurde durch diese Analysen die Expression von KaiA₆₈₀₃, KaiC1, KaiC2 und KaiC3 im *Synechocystis* Wildtyp unter Dauerlicht eindeutig belegt. Auch in den Deletionsmutanten lagen jeweils die zwei KaiC-Proteine vor, deren kodierende Gene nicht deletiert waren. Zudem wurden im *kaiC2B2* Überexpressor alle drei KaiC-Proteine nachgewiesen.

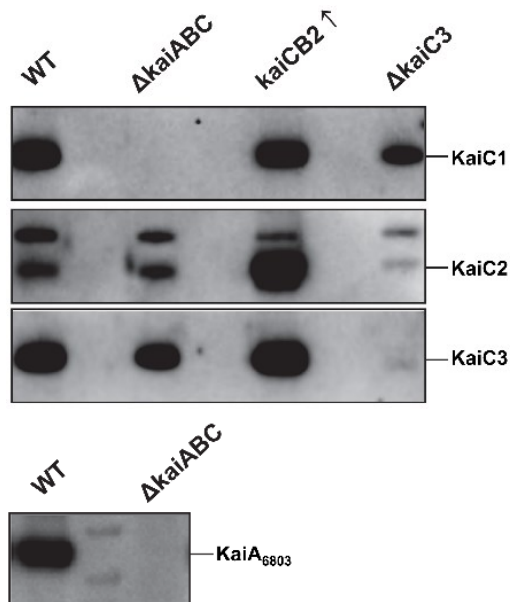


Abbildung 2-14. Analyse der Funktionalität der Kai-gerichteten Antikörper. – Die Antiseren detektieren KaiA₆₈₀₃, KaiC1, KaiC2 und KaiC3 in *Synechocystis* Extrakten. *Synechocystis* Wildtyp (WT), *Synechocystis* Δ*kaiABC* (Δ*kaiABC*), *Synechocystis* Δ*kaiC3* (Δ*kaiC3*) sowie eine *Synechocystis*-Mutante, in der KaiC2 und KaiB2 überexprimiert vorliegen (*kaiC2B2*↑), wurden im Dauerlicht angezogen. Aus diesen Kulturen gewonnene Gesamtzellextrakte wurden elektrophoretisch separiert, auf eine PVDF-Membran transferiert und anschließend eine Immuno-Detektion mit den peptidgerichteten Antiseren zur Detektion von KaiC1, KaiC2 und KaiC3 (oben) sowie dem gegen rekombinantes KaiA₆₈₀₃ gerichteten Antiserum (unten) durchgeführt. Für die Detektion von KaiA₆₈₀₃ wurden jeweils Gesamtzellextrakte mit 9 µg Protein, für die Detektion von KaiC1 und KaiC3 Extrakte mit 8 µg Protein und für die Detektion von KaiC2 Extrakte mit 4 µg Protein verwendet.

Die zur Detektion der KaiB-Homologe generierten Antikörper konnten nicht zur Analyse der KaiB-Expression in *Synechocystis* verwendet werden. Obwohl sie jeweils rekombinantes KaiB1, KaiB2 bzw. KaiB3 (zur Expression siehe 2.2.2.1) erkannten, wurden in *Synechocystis* Gesamtzellextrakten mit bis zu 30 µg Gesamtprotein keine Proteine detektiert, deren apparentes Molekulargewicht den KaiB-Proteinen zuzuordnen war (nicht gezeigt).

2.2.3.3 Zeitliche Akkumulation der Kai Proteine

Mithilfe der gegen KaiA₆₈₀₃, KaiC1, KaiC2 und KaiC3 gerichteten Antikörper sollte nun die zeitliche Akkumulation der Proteine untersucht werden. Um zugleich potenzielle diurnale und circadiane Rhythmen erfassen zu können, wurde die Expression in Zellen analysiert, die im Rahmen des LDL-Experiments geerntet worden waren (siehe Abschnitt 2.2.3.1, Abbildung 2-13). Während der ersten 8 von insgesamt 14 Probenentnahmen war die Kultur dem zwölfstündigen Hell-Dunkelrhythmus ausgesetzt (Proben 5,5; 9,5; 13,5; 17,5; 21,5; 23,5; 25,5 und 33,5). Danach blieb die Dunkelphase bei Stunde 36 aus, wodurch die Zellen bereits seit dem Anschalten des Lichts zur Stunde 24 circadianen Bedingungen unterlagen (Proben 25,5; 33,5; 37,5; 41,5; 45,5; 47,5; 49,5 und 53,5). Die zur Stunde 25,5 und 33,5 geernteten Zellen sind folglich beiden Bedingungen zuzuordnen. Zur Kontrolle wurde eine *Synechocystis* Wildtyp-Kultur unter Dauerbelichtung, aber ansonsten gleichen Bedingungen wie bei den Zeitreihen-Experimenten, angezogen und Zellen bei einer vergleichbaren OD_{750nm} geerntet.

Es wurden Gesamtzellextrakte präpariert und die darin enthaltenen Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden die Extrakte aus den während der Zeitreihe gesammelten Zellen auf einen einheitlichen Gesamtproteingehalt normalisiert. Vom Gesamtzellextrakt der unter Dauerlicht kultivierten Zellen wurde eine Verdünnungsreihe aufgetragen. Als Kontrolle dienten Gesamtzellextrakte aus *Synechocystis* Δ kaiABC, *Synechocystis* Δ kaiC3 bzw. dem *Synechocystis* kaiC2B2 Überexpressor. Nach dem Transfer der separierten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die Immuno-Detektion mit den gegen KaiA₆₈₀₃ bzw. KaiC1, KaiC2 oder KaiC3 gerichteten Antikörpern. Exemplarische Membranen sind in Abbildung 2-15 dargestellt. Hier, wie auch in technischen Replikaten, schwankten die Signalintensitäten der detektierten Kai-Proteinbanden geringfügig.

Um zu überprüfen ob reproduzierbare Unterschiede im Kai-Proteinniveau zu den einzelnen Zeitpunkten bestanden, wurden mehrere Wiederholungen durchgeführt. Durch Auftragung der Signalintensitäten der detektierten Kai-Proteinbanden gegen die Proteinmenge im Gesamtzellextrakt wurde anhand der Verdünnungsreihe jeweils eine Kalibrierungsgerade erstellt, die zur Berechnung der relativen Kai-Proteinmenge in der Zeitreihe diente. Da davon auszugehen ist, dass kein Protein zu 100 % konstant in der Zelle vorliegt, wurde auf eine Normalisierung auf ein Kontrollprotein verzichtet. Stattdessen erfolgte die Auftragung der Proben auf das Gel bei den Replikaten in zwei verschiedenen Reihenfolgen, um den Einfluss von Ladefehlern oder ungleichmäßigem Proteintransfer zu minimieren

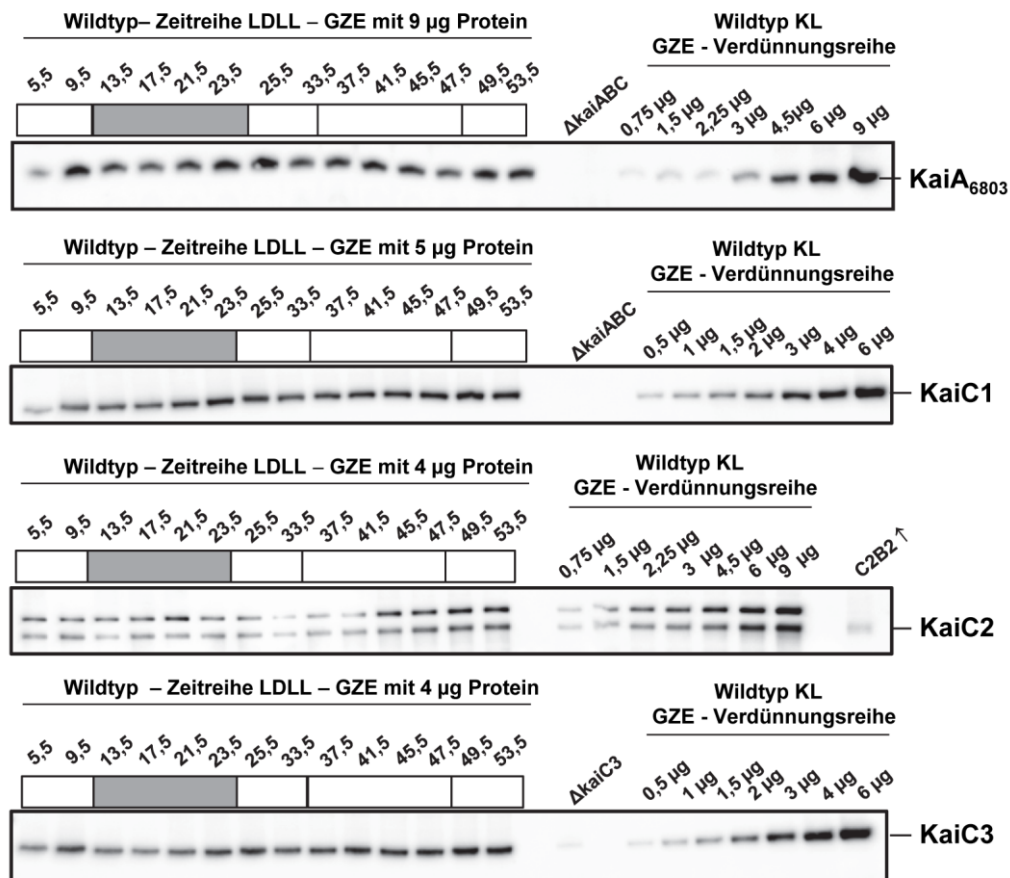


Abbildung 2-15. Exemplarische Westernblot-Analysen zur relativen Quantifizierung der Kai-Proteine in LDLL. - KaiA₆₈₀₃, KaiC1, KaiC2 und KaiC3 lagen unter diurnalen und circadianen Bedingungen nahezu konstant in der Zelle vor. *Synechocystis* wurde für drei Tage in LD synchronisiert, einen weiteren Tag in LD angezogen und dann in LL überführt (LDLL-Reihe, Abbildung 2-13, mittlere Spalte). Ab der Mitte des auf die Synchronisierung folgenden Tages wurden über 48 Stunden zu insgesamt 14 Zeitpunkten Zellen geerntet und Gesamtzellextrakte (GZE) daraus präpariert (5,5-53,5). Die Gesamtzellextrakte wurden - normalisiert auf den Proteingehalt - auf PAA-Gele aufgetragen, elektrophoretisch separiert und auf PVDF-Membranen transferiert. Anschließend erfolgte eine Immuno-Detektion mit den gegen KaiA₆₈₀₃, KaiC1, KaiC2 oder KaiC3 gerichteten Antisera. Um zu überprüfen ob die eingesetzten Proteinmengen im Bereich einer linearen Antikörperbindung lagen, wurde zudem auf jedes Gel eine Verdünnungsreihe eines Gesamtzellextrakts aufgetragen. Die hierfür verwendeten Zellen stammten aus einer *Synechocystis*-Kultur, die unter kontinuierlicher Belichtung ohne vorherige Synchronisierung (KL) aber sonst gleichen Bedingungen wie die LDLL-Kultur angezogen worden war. Die Verdünnungsreihe diente auch zur relativen Quantifizierung (Abbildung 2-16). Über der Verdünnungsreihe ist die Proteinmenge im Gesamtzellextrakt in µg angegeben. Zur eindeutigen Zuordnung der detektierten Proteinbanden wurden Gesamtzellextrakte der *Synechocystis kaiABC* Deletionsmutante (Δ kaiABC, 9 µg Gesamtprotein bei α -KaiA-Serum, 6 µg Gesamtprotein bei α -KaiC1-Serum), des *Synechocystis kaiC2B2* Überexpressors (kaiC2B2[↑], bei α -KaiC2-Antikörper) bzw. der *Synechocystis kaiC3* Deletionsmutante (Δ kaiC3, 6 µg Gesamtprotein bei α -KaiC3-Serum) mitgeführt. Dunkelphasen bei der Kultivierung sind durch einen grauen, Lichtphasen durch einen weißen Balken symbolisiert.

In Abbildung 2-16 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Kai-Proteinmengen dargestellt, die in drei bis acht technischen Wiederholungen ermittelt wurden. Alle untersuchten Kai-Proteine waren bei der Kultivierung in LDLL weniger abundant als bei Kultivierung im Dauerlicht. Im Mittel aller Zeitpunkte lag die KaiA₆₈₀₃-Menge bezogen auf die Dauerlicht-Kultur bei 46 %, die Menge der KaiC-Proteine bei 58 % (KaiC2), 66 % (KaiC3)

bzw. 71 % (KaiC1). Allgemein wurden nur geringfügige Veränderungen im Kai-Proteingehalt detektiert. Die gemessenen Schwankungen in der relativen Abundanz von KaiC1 und KaiC2 waren laut einer einfaktoriellen Varianzanalyse nicht signifikant unterschiedlich. Die Schwankungen im relativen Level von KaiC3 waren dieser Analyse zufolge zwar statistisch signifikant, wiesen aber nur eine Amplitude von 0,13 auf. Bei der Bestimmung der Proteingehalte in den Gesamtzellextrakten, die zur Normalisierung bei der Gelbeladung dienten, waren relative Standardabweichungen von bis zu 10 % bei den technischen Replikaten aufgetreten. Zudem müssen trotz aller Optimierungen gewisse Fehler bei der Probenverdünnung, Beladung des Gels, dem Blotten und der Immuno-Detektion einkalkuliert werden. Darum wurden die Änderungen des KaiC3-Levels als nicht biologisch relevant betrachtet. Stattdessen ist davon auszugehen, dass auch KaiC3 nahezu konstant in der Zelle vorlag.

Die vermeintliche Signifikanz der Messunterschiede bezüglich der KaiA-Abundanz beruhte auf dem erhöhten Level zur Stunde 9,5. Die KaiA₆₈₀₃-Menge lag 24 Stunden später, also zur gleichen Tageszeit (Stunde 33,5), unterhalb dieses Mittelwerts. KaiC1 und KaiC3 waren zur Stunde 9,5 in dem biologischen Replikat, das für die Quantifizierung von KaiA₆₈₀₃ verwendet wurde, abundanter als in einem zweiten biologischen Replikat. Darum kann angenommen werden, dass die höhere KaiA₆₈₀₃-Menge zu diesem Zeitpunkt nicht auf ein 24-stündiges Muster unter diurnalen Bedingungen zurückging, sondern einen Ausreißer in dem ersten biologischen Replikat darstellte. Insgesamt wurde folglich für keines der hier untersuchten Kai-Proteine eine diurnal oder circadian oszillierende Akkumulation in *Synechocystis* beobachtet.

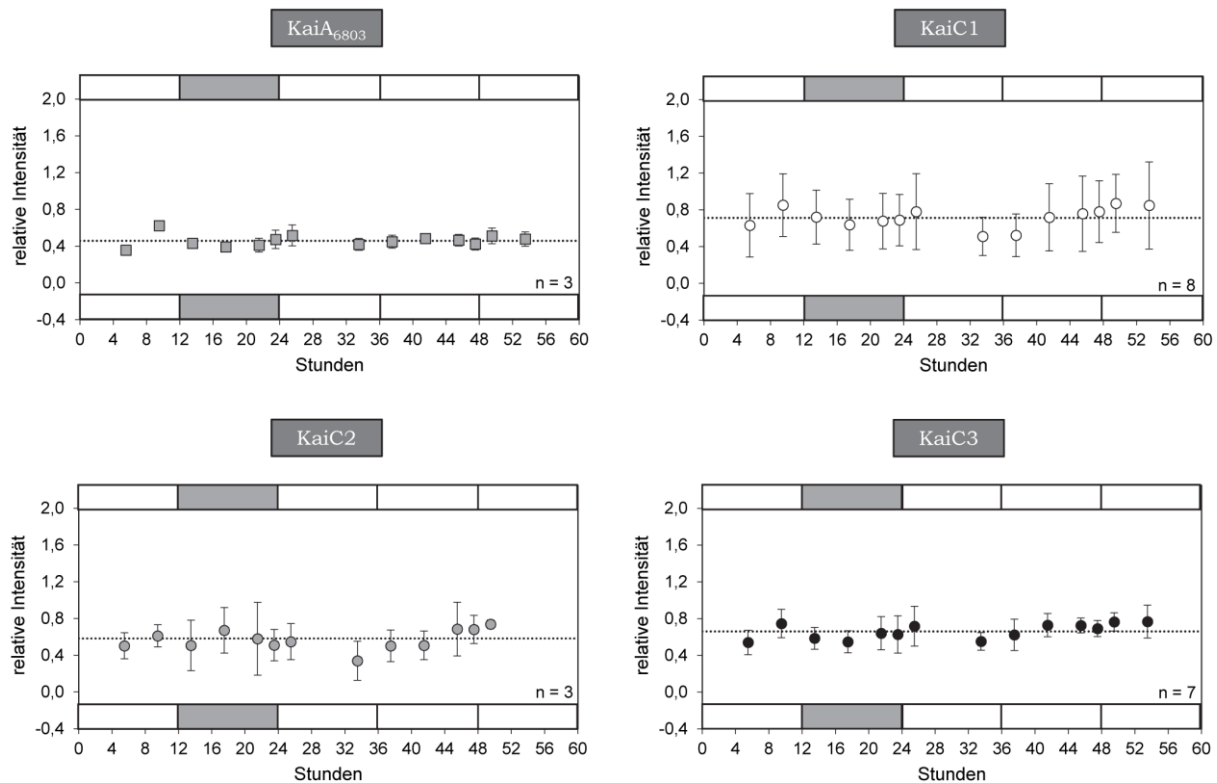


Abbildung 2-16. Relative Quantifizierung der Kai-Proteinmengen in LDLL. - KaiA₆₈₀₃ und die drei KaiC-Proteine zeigten keine rhythmische Akkumulation. KaiA₆₈₀₃, KaiC1, KaiC2 und KaiC3 wurden, wie in Abbildung 2-15 dargestellt, durch Westernblot-Analysen in den LDLL-Gesamtzellextrakten detektiert. Die relative Abundanz der Proteine im Vergleich zu unter Dauerlicht kultivierten Zellen wurde mithilfe der Geradengleichung einer Kalibrierungsgerade berechnet. Dabei wurden nur Westernblots berücksichtigt, bei denen die Signalintensität der Kai-Proteinbanden in den LDLL-Extrakten im Bereich der linearen Eichreihe lag. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung sowie der Mittelwert aller Zeitpunkte (unterbrochene horizontale Linie). Zudem ist in den Diagrammen die Anzahl der jeweils berücksichtigten technischen Replikate (n) angegeben. Bei den Quantifizierungen von KaiA₆₈₀₃ und KaiC2 sind Messungen aus einem biologischen Replikat, bei KaiC1 und KaiC3 Messungen aus zwei biologischen Replikaten eingeflossen. Dunkel- und Lichtphasen bei der Kultivierung sind durch graue und weiße Balken symbolisiert.

2.2.3.4 Zeitliche Lokalisation der Kai-Proteine

Im Folgenden sollte analysiert werden, ob die Verteilung der Kai-Proteine in der Zelle einer zeitlichen Veränderung in LD oder LL unterliegt. Dazu wurden die Gesamtzellextrakte aus der LDLL-Reihe (Kapitel 2.2.3.1) auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt und durch Zentrifugation in lösliche und Membranbestandteile getrennt. Das Membranpellet wurde einmal gewaschen, um restliche lösliche Proteine vollständig zu entfernen und dann in einem zu dem Gesamtzellextrakt äquivalenten Volumen Thylakoidpuffer (Zusammensetzung siehe 4.2.3.3) aufgenommen. Auch die lösliche Fraktion wurde ein zweites Mal zentrifugiert, um potenziell verbliebene Membranbestandteile zu sedimentieren.

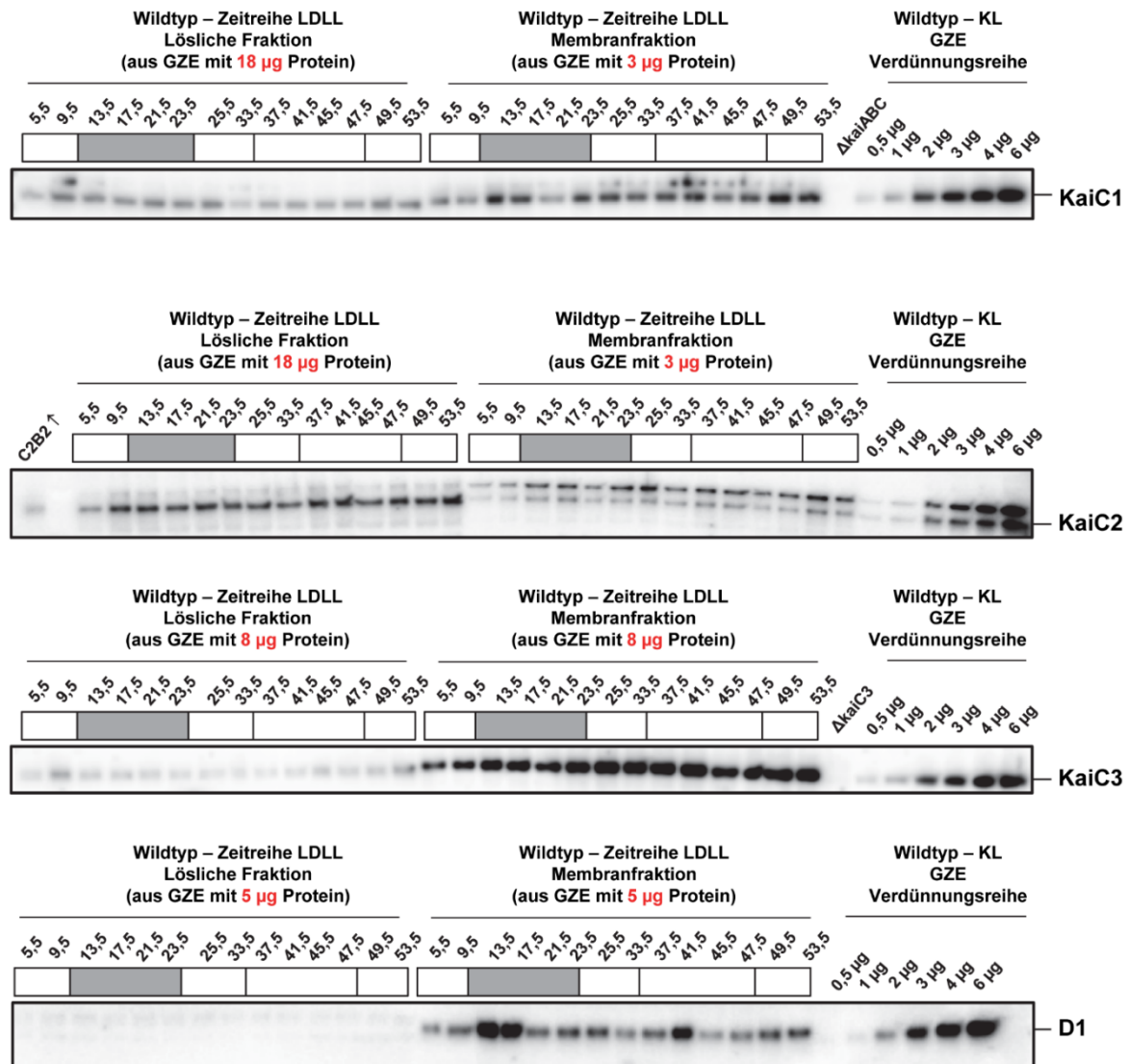


Abbildung 2-17. Exemplarische Westernblot-Studien zur Analyse der Abundanz der KaiC-Proteine im Cytosol und der Membranfraktion. – Der Hauptteil der KaiC-Proteine lag membranassoziiert vor. Gesamtzellextrakte (GZE) aus dem LDLL-Experiment (siehe 2.2.3.1) wurden auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt und durch Zentrifugation in eine lösliche und Membranfraktion getrennt. Definierte Volumina wurden elektrophoretisch separiert, auf PVDF-Membranen transferiert und einer Immuno-Detektion unter Verwendung der α -KaiC-Antikörper bzw. des α -D1-Antikörpers (als Kontrolle) unterzogen. In rot ist die Proteinmenge angegeben, die im entsprechenden Volumen des fraktionierten Gesamtzellextrakt vorhanden war. Gesamtzellextrakte aus *Synechocystis* Δ kaiABC (Δ kaiABC), dem *Synechocystis* kaiC2B2-Überexpressor (kaiC2B2 \uparrow) bzw. *Synechocystis* Δ kaiC3 (Δ kaiC3) dienten der eindeutigen Zuordnung der KaiC-Proteinbanden. Zur relativen Bestimmung der detektierten Proteinmengen wurde eine Verdünnungsreihe des Gesamtzellextrakts der Dauerlicht-Kultur mitgeführt (KL). Die Zahlen über der LDLL-Zeitreihe geben die Zeitpunkte der Probennahme nach Anschalten des Lichts am ersten Tag des Experiments wieder. Graue Balken kennzeichnen die Dunkelperioden, weiße Balken die Lichtphasen bei der Kultivierung.

Definierte Volumina der so präparierten Extrakte wurden auf ein PAA-Gel appliziert und einer Westernblot-Analyse unterzogen. Eine Verdünnungsreihe des bereits zuvor verwendeten Gesamtzellextrakts der unter Dauerbelichtung angezogenen Zellen diente als Vergleich (Abbildung 2-17). Alle KaiC-Proteine waren sowohl in der löslichen als auch in der

Membranfraktion nachweisbar. Dazu musste bei der Immuno-Detektion mit den α -KaiC1 und α -KaiC2-Seren allerdings im Vergleich zur Membranfraktion die dreifache Menge des löslichen Extrakts verwendet werden. Zur Abschätzung der Verteilung der Kai-Proteine wurde zunächst jeweils die relative Menge im Vergleich zum Gesamtzellextrakt der unter Dauerbelichtung angezogenen Kultur berechnet (Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Volumina). Dazu wurde, wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben, eine Kalibrierungsgerade erstellt. Für jeden Zeitpunkt wurde die relative Signalintensität des löslichen und membranassoziierten KaiC-Proteins ermittelt und der Anteil am Gesamtsignal (löslich + membranassoziiert) berechnet. Der cytosolische Anteil an KaiC2 lag zwischen 25-50 %, der lösliche Anteil an KaiC1 und KaiC3 sogar unter 25 %. Alle KaiC-Proteine erschienen in den Membranfraktionen zunächst unterschiedlich abundant. So stieg die Signalintensität in den zur Stunde 13,5 und 17,5 entnommenen Extrakten z.B. deutlich an. Bei Kontrollinkubationen mit einem α -D1-Antikörper waren jedoch vergleichbare Muster zu erkennen und die beobachteten Veränderungen demnach unterschiedlichen Verlusten bei der Präparation der Membranfraktion geschuldet. Folglich wurde weder unter diurnalen noch unter circadianen Wachstumsbedingungen eine signifikante Modulation des löslichen und membranassoziierten Anteils der KaiC-Proteine ermittelt.

2.2.3.5 Untersuchungen zur räumlichen Verteilung der Kai-Proteine bei photoautotrophem und mixotrophem Wachstum

Wo genau liegen die Kai-Proteine in der Zelle vor? Ist der membranständige Teil nur lose und peripher an die Membran angelagert oder fest an diese assoziiert bzw. in sie integriert? Um dies zu beantworten, wurden weiterführende Westernblot-Analysen sowie transmissions-elektronenmikroskopische (TEM) Studien nach Immuno-Gold-Labeling durchgeführt. Da eine phänotypische Charakterisierung von *Synechocystis* Δ kaiABC durch Anja K. Dörrich Unterschiede bei photoautotrophem und mixotrophem Wachstum enthüllte [207], erfolgten die Untersuchungen unter diesen beiden Bedingungen.

2.2.3.5.1 Photoautotrophe und mixotrophe Kultivierung von *Synechocystis* in LD

Synechocystis Wildtyp, *Synechocystis* Δ kaiABC und *Synechocystis* Δ kaiC3 wurden einmal - wie bei den vorherigen Experimenten - in Abwesenheit organischer Kohlenstoffquellen (photoautotrophes Wachstum) und einmal in Anwesenheit von 0,2 % Glucose im Medium

(mixotrophes Wachstum) in LD angezogen. Der Wildtyp und die *kaiC3*-Deletionsmutante wurden zuvor für drei Tage in LD synchronisiert. Da das Wachstum von *Synechocystis* Δ *kaiABC* in LD stark beeinträchtigt ist [207], wurde diese Mutante abweichend davon nur durch eine zwölfstündige Dunkelphase synchronisiert. Etwa in der Mitte der Nacht, die auf die Synchronisierung folgte (ZT 17,5), sowie der Mitte des darauffolgenden Tages (ZT 29,5) wurden Zellen für Westernblot-Analysen (Abbildung 2-18 und Abbildung 2-23) und mikroskopische Studien (Abbildung 2-19, Abbildung 2-20 und Abbildung 2-22) geerntet und verschiedene physiologische Parameter erfasst (Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1. Physiologische Parameter der *Synechocystis*-Zellen, die für Kai-Lokalisationsstudien verwendet wurden

ZT 17,5	Photoautotrophes Wachstum			Mixotrophes Wachstum		
	Wildtyp	Δ <i>kaiABC</i>	Δ <i>kaiC3</i>	Wildtyp	Δ <i>kaiABC</i>	Δ <i>kaiC3</i>
OD _{750nm}	0,428	0,421	0,525	0,703	0,659	0,491
Zellzahl (10 ⁷ ml ⁻¹)	3,36	3,30	4,12	5,52	5,17	3,85
Phycocyanin/ Chlorophyll- Verhältnis	0,86	0,73	0,80	0,90	0,74	0,82
Chlorophyllgehalt (pg / Zelle)	0,115 ± 0,006	0,110 ± 0,003	0,104 ± 0,002	0,122 ± 0,002	0,118 ± 0,001	0,108 ± 0,006
Proteingehalt (pg / Zelle)	2,27 ± 0,05	1,96 ± 0,02	1,90 ± 0,1	2,42 ± 0,02	2,09 ± 0,03	1,92 ± 0,04
ZT 29,5	Photoautotrophes Wachstum			Mixotrophes Wachstum		
	Wildtyp	Δ <i>kaiABC</i>	Δ <i>kaiC3</i>	Wildtyp	Δ <i>kaiABC</i>	Δ <i>kaiC3</i>
OD _{750nm}	0,584	0,474	0,5556	0,846	0,771	0,689
Zellzahl (10 ⁷ ml ⁻¹)	4,58	3,72	4,36	6,64	6,05	5,41
Phycocyanin/ Chlorophyll- Verhältnis	0,87	0,73	0,79	0,90	0,76	0,85
Chlorophyllgehalt (pg / Zelle)	0,116 ± 0,000	0,119 ± 0,003	0,120 ± 0,001	0,138 ± 0,007	0,139 ± 0,001	0,119 ± 0,001
Proteingehalt (pg / Zelle)	2,38 ± 0,01	2,09 ± 0,06	2,03 ± 0,13	2,57 ± 0,07	2,33 ± 0,17	2,12 ± 0,02

Die OD_{750nm} der Zellsuspensionen lag unter beiden Bedingungen und zu beiden Zeitpunkten im gleichen Bereich wie bei den Zeitreihen-Experimenten (LDLL, LDLD und LDDD, vergleiche Abbildung 2-13). Anhand des zuvor für den *Synechocystis* Wildtyp ermittelten Faktors (siehe Abschnitt 2.2.3.1) wurde die Zellzahl aus der OD_{750nm} berechnet. Dabei wurde für *Synechocystis kaiABC* und *Synechocystis kaiC3* ohne weitere Prüfung die gleiche Korrelation zwischen OD_{750nm} und Zellzahl angenommen. Anhand der Aufnahme von Absorptionsspektren

ganzer Zellen wurden Verhältnisse von Phycocyanin und Chlorophyll ermittelt, die ebenfalls mit den Zeitreihen-Experimenten vergleichbar waren. Dabei zeigte sich das Pigmentverhältnis in *Synechocystis* *ΔkaiABC* jedoch stets am niedrigsten. Die Zellen wiesen einen ähnlichen Protein- und Chlorophyllgehalt wie in den in Abschnitt 2.2.3.1 beschriebenen Experimenten auf (vergleiche Abbildung 2-13 und Beck *et al.* [212]). Alle ermittelten physiologischen Parameter waren in diesem exemplarischen Experiment bei mixotrophem Wachstum etwas größer und jeweils am Tag (ZT 29,5) geringfügig höher als in der Nacht (ZT 17,5). Insgesamt traten aber keine großen Unterschiede auf. Darum ist davon auszugehen, dass sich die Zellen unter allen Bedingungen in einem vergleichbaren physiologischen Zustand befanden.

2.2.3.5.2 Membranassoziation des KaiA₆₈₀₃ und der KaiC-Proteine bei photoautotrophem und mixotrophem Wachstum

Die Stärke der Membranassoziation cyanobakterieller Proteine kann durch die Inkubation mit hochmolaren Salzlösungen überprüft werden [213-216]. Zur weitergehenden Analyse der Kai-Proteine wurden die bei photoautotrophem und mixotrophem Wachstum geernteten Zellen aufgeschlossen, die gewonnenen Gesamtzellextrakte auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt und in lösliche und Membranbestandteile fraktioniert. Die Membranfraktion wurde schrittweise einmal in Abwesenheit und anschließend einmal in Anwesenheit von 2M NaCl gewaschen. Nach der Sedimentation wurden die verbliebenen Membranproteine in einem zum Ausgangsgesamtzellextrakt äquivalenten Volumen Thylakoidpuffer (ohne NaCl) gelöst, alle Fraktionen mit SDS-Probenpuffer versetzt und KaiA₆₈₀₃ sowie die KaiC-Proteine nach Westernblotting mit den entsprechenden Antikörpern detektiert (Abbildung 2-18). Erneut waren alle KaiC-Proteine und auch KaiA₆₈₀₃ sowohl in der löslichen als auch in der Membranfraktion zu finden. Zur Kontrolle wurde das membrangebundene D1-Protein in den Extrakten detektiert und die fraktionierten Proteine zudem separat nach elektrophoretischer Trennung durch Coomassie angefärbt. Dies enthüllte kleine Unterschiede bei der Präparation der Membranproteine. Z. B. war die D1-Bande in der Fraktion M1 der „Tag-Probe“ nach photoautotrophem Wachstum (29,5 – Gluc, Abbildung 2-18) stets dünner als im Gesamtzellextrakt. Demnach waren Membranproteine bei der Präparation verloren gegangen. Unter Berücksichtigung dieser präparativen Unterschiede ließ sich der membranständige Anteil der KaiC-Proteine auf jeweils mindestens 50 % schätzen. Lediglich in der „Tag-Probe“ bei mixotrophem Wachstum war bei dieser einmaligen Analyse mehr cytosolisches als membranassoziiertes KaiC1 vorhanden (29,5 + Gluc, Abbildung 2-18).

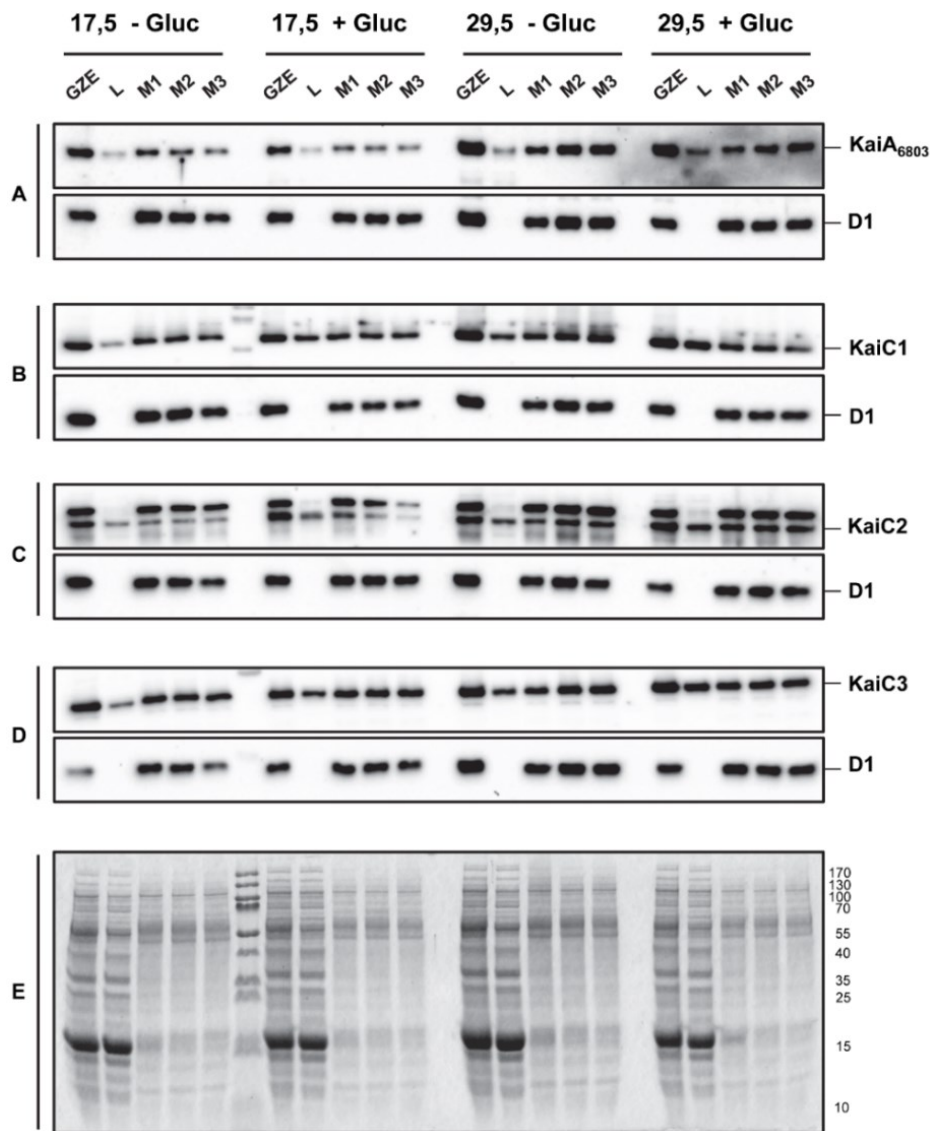


Abbildung 2-18. Analyse der Stärke der Membranassoziation bei photoautotrophem und mixotrophem Wachstum - KaiA₆₈₀₃, KaiC1, KaiC2 und KaiC3 interagierten größtenteils stark mit den Membranen. *Synechocystis* wurde photoautotroph (- Gluc) oder mixotroph (+ Gluc) in LD angezogen. Zur Stunde 17,5 und 29,5 wurden Zellen geerntet, in lösliche und Membranbestandteile fraktioniert und die darin enthaltenen Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Die Normalisierung erfolgte auf die Proteinmenge im Ausgangs-Gesamtzellextrakt. Nach anschließendem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde eine Immuno-Detektion mit den gegen KaiA₆₈₀₃ (A), KaiC1 (B), KaiC2 (C) oder KaiC3 (D) gerichteten Antikörpern durchgeführt. Alle Membranen wurden *gestrippt* und einer Kontrolldetektion mit einem α -D1-Antikörper unterzogen. Zudem wurden gleiche Volumina der verschiedenen Extrakte auf ein PAA-Gel aufgeladen und die separierten Proteine anschließend mit Coomassie gefärbt (E). GZE: Gesamtzellextrakt, L: lösliche Proteine im Überstand nach zweimaliger Zentrifugation, M1: in Thylakoidpuffer resuspendierte Membranfraktion nach Zentrifugation, M2: Membranfraktion in Thylakoidpuffer nach einmaligem Waschen mit Thylakoidpuffer, M3: Membranfraktion in Thylakoidpuffer nach einmaligem Waschen mit Thylakoidpuffer und darauffolgendem einmaligem Waschen in Thylakoidpuffer mit 2 M NaCl.

Allgemein schien der cytosolische Anteil aller drei KaiC-Proteine bei mixotrophem Wachstum etwas größer zu sein als bei photoautotrophem Wachstum. Der Anteil an cytosolischem KaiA₆₈₀₃ war hingegen unter allen Bedingungen gleichbleibend gering. Nach einer groben Schätzung lag mehr als 75 % des Proteins in der Membranfraktion vor. Die membranständigen

Kai-Proteine konnten durch das Waschen mit Thylakoidpuffer nicht von der Membran gelöst werden. Da sie selbst in Anwesenheit von 2 M NaCl dort verblieben, ist davon auszugehen, dass sie fest an die Membran assoziiert oder in diese integriert statt nur locker peripher angelagert waren.

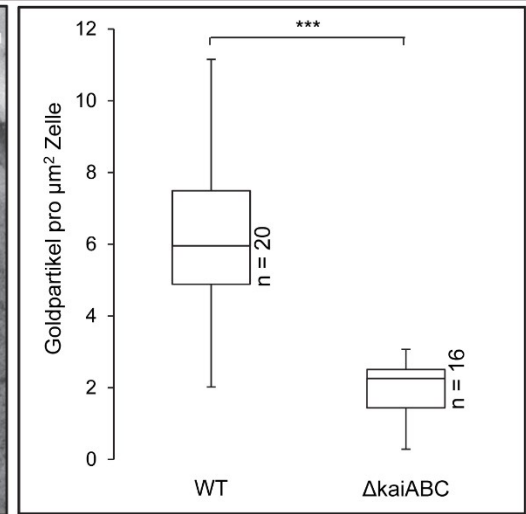
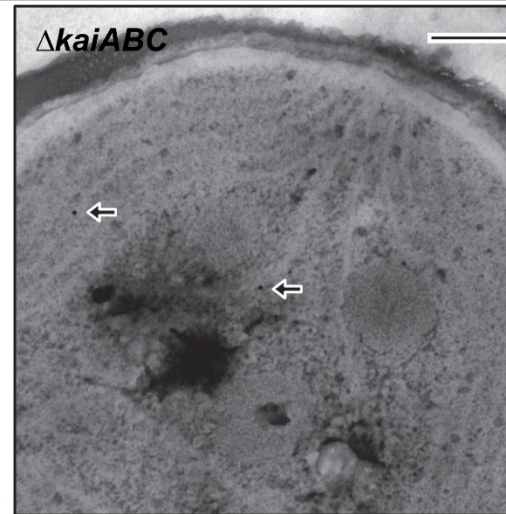
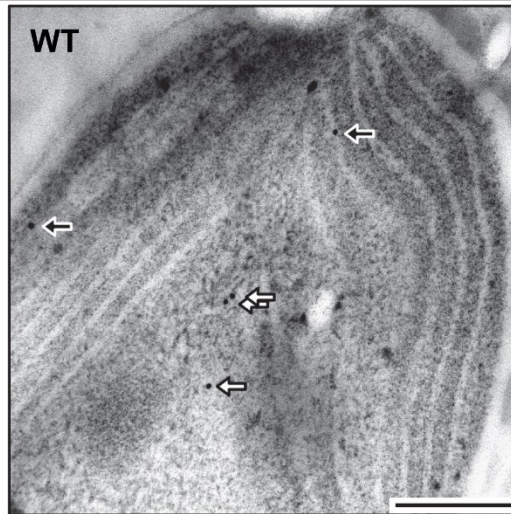
2.2.3.5.3 Verteilung von KaiA₆₈₀₃ und KaiC3 in der Zelle

An welcher Membran sind die Kai-Proteine lokalisiert? Liegen sie verteilt in der Zelle oder konzentriert in diskreten Arealen vor? Um diesen Fragestellungen auf den Grund zu gehen, wurden im Rahmen des zuvor beschriebenen Experiments (siehe auch Tabelle 2-1) in der Mitte der Nacht Zellen des *Synechocystis* Wildtyp sowie der *Synechocystis kaiABC*- und *Synechocystis kaiC3*-Deletionsmutante für mikroskopische Analysen fixiert. Die dehydrierten Zellen wurden mit *LR white* infiltriert und anschließend Ultradünnschnitte präpariert⁶. Diese wurden nach Blockierungs- und Waschschritten - wie in Abbildung 2-19 und Abbildung 2-20 angegeben - zunächst mit α -KaiA-Serum, α -KaiC3-Serum oder 10 % BSA anstelle eines primären Antikörpers inkubiert.

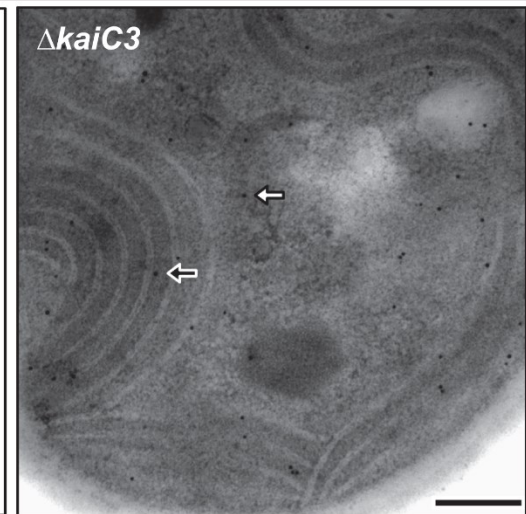
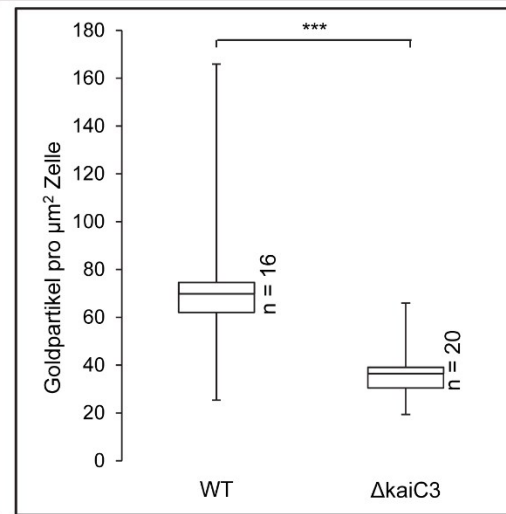
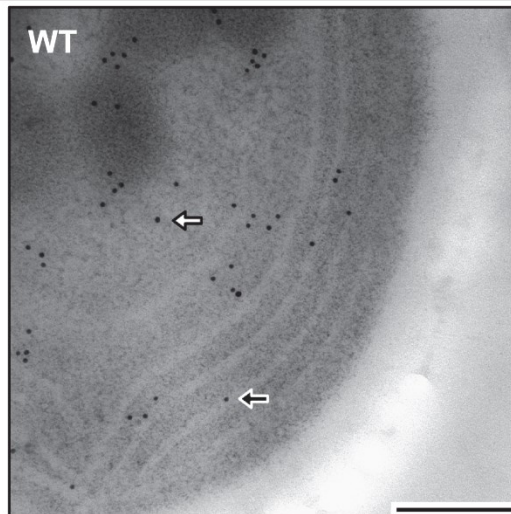
Zur indirekten Lokalisation der von den Primärantikörpern gebundenen Proteine durch TEM erfolgte anschließend die Inkubation mit einem Gold-gelabelten Sekundärantikörper. In den Zellen, die mit BSA inkubiert worden waren, wurden so keine Goldpartikel nachgewiesen (exemplarisch gezeigt in Abbildung 2-19 und Abbildung 2-20). Eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers an die Zelldünnschnitte konnte folglich ausgeschlossen werden. In den Zellen des *Synechocystis* Wildtyps, aber auch der Deletionsmutanten, wurden indes Goldpartikel gefunden. Demzufolge interagierten die α -KaiA- und α -KaiC3-Antikörper nicht nur mit KaiA₆₈₀₃ und KaiC3, sondern auch mit zusätzlichen *Synechocystis*-Proteinen.

⁶ Die Ultramikrotomie zur Anfertigung der Dünnschnitte erfolgte durch Giulia Mastroianni in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Conrad M. Mullineaux (*Queen Mary University*, London), die mich freundlicherweise auch während der TEM-Analysen im Wechsel mit Dennis J. Nürnberg technisch bei der Bedienung des Mikroskops unterstützte.

**α -KaiA-
Antikörper**



**α -KaiC3-
Antikörper**



se

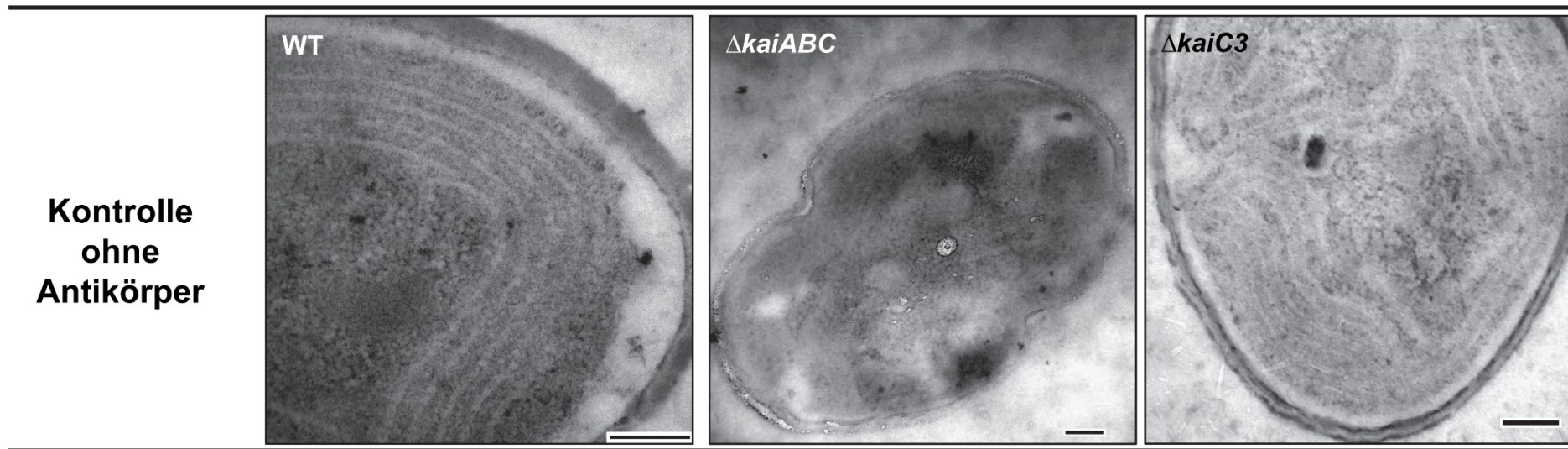
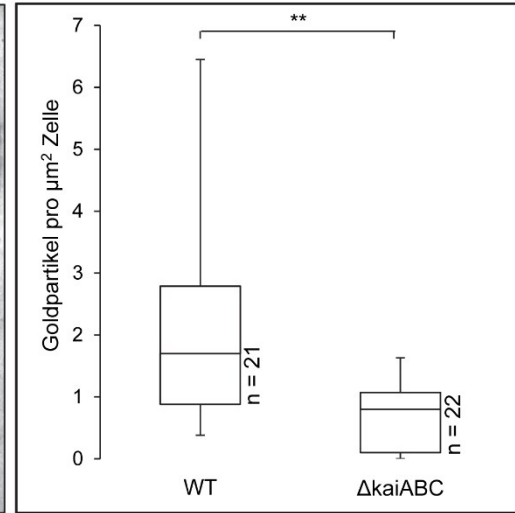
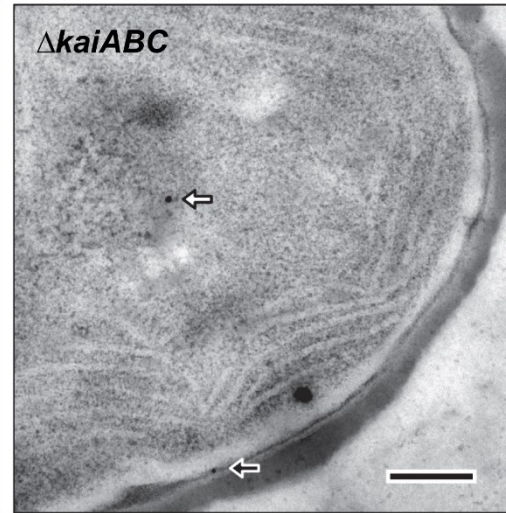
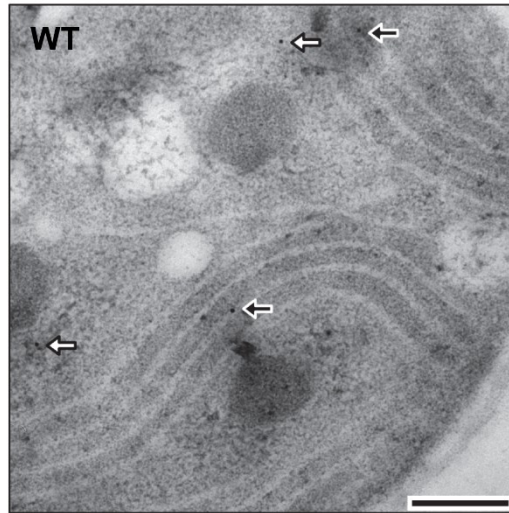
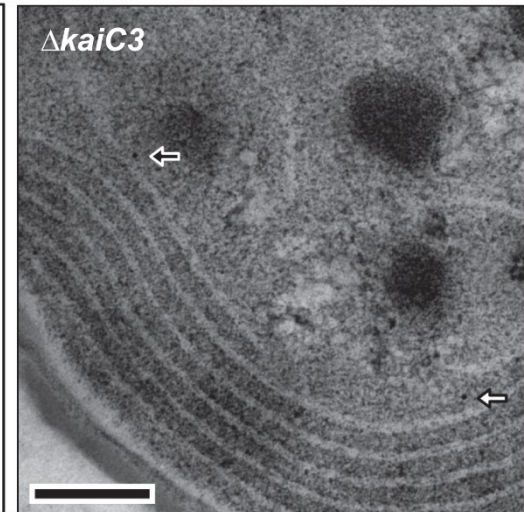
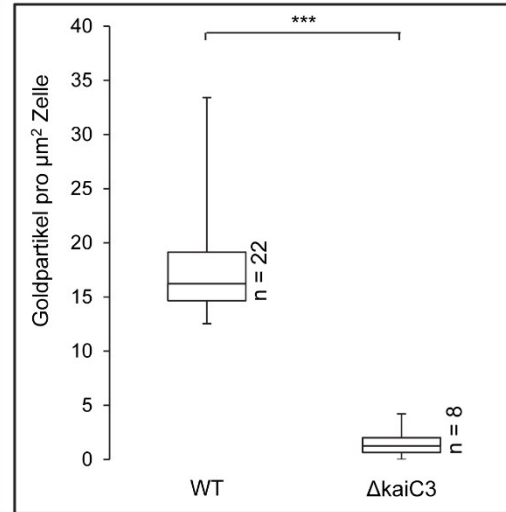
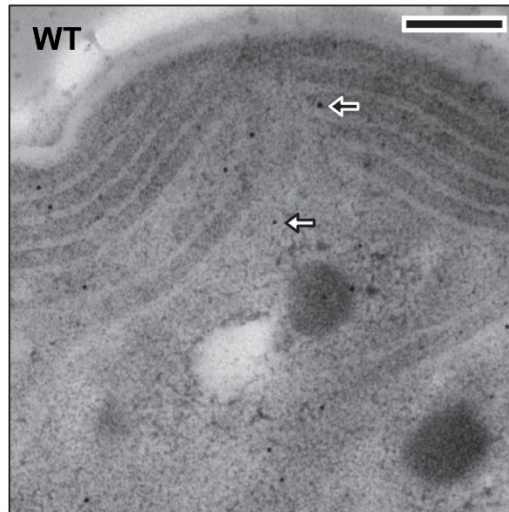


Abbildung 2-19. TEM-Aufnahmen nach Immuno-Gold-Labeling zur Lokalisation von KaiA₆₈₀₃ und KaiC3 bei photoautotrophen Wachstum – Beide Proteine befanden sich im Cytosol und an den Thylakoidmembranen. *Synechocystis* Wildtyp (WT) wurde in LD in BG11-Medium in Abwesenheit organischer Kohlenstoffquellen angezogen und Zellen in der Mitte der Nacht (ZT 17,5) geerntet und fixiert. Dünnschnitte der Zellen wurden einem Immuno-Gold-Labeling mit anschließender Färbung durch Uranyl-Acetat und Blei-Citrat unterzogen und durch Transmissions-Elektronenmikroskopie analysiert. Als primäre Antikörper dienten dabei das α -KaiA-Serum (obere Reihe) und α -KaiC3-Serum (mittlere Reihe). Als Kontrolle wurde 10 % BSA anstelle eines Antikörpers genutzt (Kontrolle, untere Reihe). Die gleichen Analysen wurden mit *Synechocystis* Δ kaiABC (Δ kaiABC, mittlere Spalte) und *Synechocystis* Δ kaiC3 Zellen (Δ kaiC3, rechte Spalte) durchgeführt und die Partikel in Zellquerschnitten von Wildtyp und Mutante ausgezählt. In den Box-Whisker-Plots sind die Mediane sowie der Interquartilsabstand zwischen dem 1. und 3. Quartil der detektierten Partikel in 16 bzw. 20 Zellen angegeben. Die Whisker kennzeichnen die Spannweite zwischen den minimalen und maximalen Werten. Bei einem Zwei-Stichproben t-test, lag der p-Wert, also die Wahrscheinlichkeit, dass nur zufällig unterschiedliche Partikelzahlen pro Zelle gemessen wurden, unter 0,001 was als hoch signifikant (***) gewertet wurde. Schwarze Pfeile mit weißem Rahmen markieren Goldpartikel an den Membranen, weiße Pfeile mit schwarzem Rahmen Goldpartikel im Cytosol. Der Größenbalken entspricht 200 nm.

**α -KaiA-
Antikörper**



**α -KaiC3-
Antikörper**



se

**Kontrolle
ohne
Antikörper**

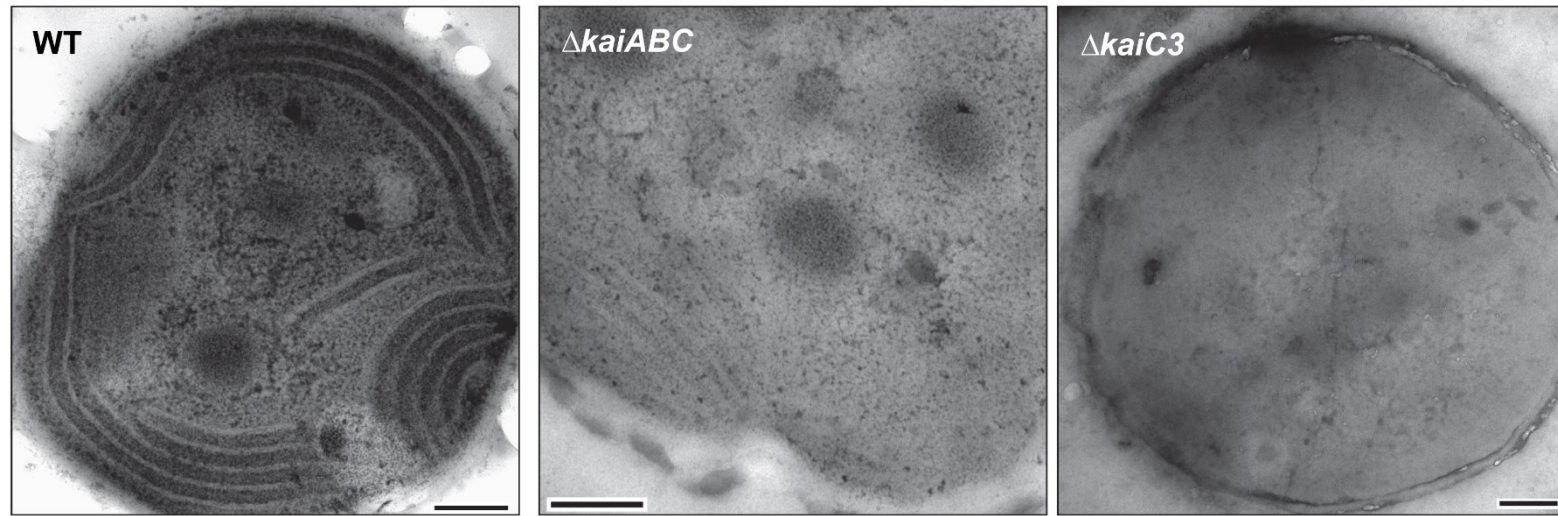


Abbildung 2-20. TEM-Aufnahmen nach Immuno-Gold-Labeling zur Analyse der Verteilung von KaiA₆₈₀₃ und KaiC3 bei mixotrophem Wachstum – KaiA₆₈₀₃ und KaiC3 lokalisieren im Cytosol und an den Thylakoidmembranen. *Synechocystis* Wildtyp (WT, 1. Spalte), *Synechocystis* Δ kaiABC (Δ kaiABC, mittlere Spalte) und *Synechocystis* Δ kaiC3 Zellen (Δ kaiC3, rechte Spalte) wurden mixotroph in LD kultiviert. Dünnschnitte von in Mitte der Nacht (ZT 17,5) geernteten Zellen wurden zunächst mit α -KaiA-Serum (obere Reihe), α -KaiC3-Serum (mittlere Reihe) oder 10 % BSA anstelle eines primären Antikörpers (untere Reihe) inkubiert und nach darauffolgender Inkubation mit einem Goldgelabelten sekundären Antikörper elektronenmikroskopisch untersucht. Die Goldpartikel in 8-22 Zellquerschnitten wurden ausgezählt und die Gesamtmenge an Partikeln pro μm^2 Zellfläche berechnet. In den Box-Whisker-Plots sind die Mediane sowie der Interquartilsabstand zwischen dem 1. und 3. Quartil der detektierten Partikel in 16 bzw. 20 Zellen angegeben. Die Whisker kennzeichnen die Spannweite zwischen den minimalen und maximalen Werten. Bei einem Zwei-Stichproben t-test, lag der p-Wert, also die Wahrscheinlichkeit, dass nur zufällig unterschiedliche Partikelzahlen pro Zelle gemessen wurden, unter 0,01 bzw. 0,001 was als sehr signifikant (**) bzw. hoch signifikant (***) gewertet wurde. Schwarze Pfeile mit weißem Rahmen markieren Goldpartikel an den Membranen, weiße Pfeile mit schwarzem Rahmen Goldpartikel im Cytosol. Der Größenbalken entspricht 200 nm.

Nach Immuno-Gold-Labeling mit α -KaiA-Serum und Quantifizierung in 16-22 Zelldünnschnitten betrug der Mittelwert der Goldpartikelzahl in der *kaiABC*-Deletionsmutante nach photoautotrophem Wachstum nur ca. 32 %, nach mixotrophem Wachstum nur etwa 40 % der entsprechenden Mittelwerte im *Synechocystis* Wildtyp. Etwa ein Drittel der Goldpartikel im *Synechocystis* Wildtyp repräsentierte folglich nicht KaiA₆₈₀₃. Diese Unterschiede zwischen *Synechocystis* Wildtyp und *kaiABC*-Deletionsmutante erwiesen sich in einem Zwei-Stichproben t-test allerdings als hoch signifikant (photoautotrophes Wachstum, Box-Whisker-Plot in Abbildung 2-19) bzw. sehr signifikant (mixotrophes Wachstum, Box-Whisker-Plot in Abbildung 2-20). Auch die Zahl an Goldpartikeln pro μm^2 Zellfläche, die nach Inkubation mit dem α -KaiC3-Serum detektiert wurde, war bei beiden Wachstumsbedingungen im *Synechocystis* Wildtyp hoch signifikant größer als in *Synechocystis* Δ *kaiC3* (Box-Whisker-Plot in Abbildung 2-19 und Abbildung 2-20). Im Schnitt lag der prozentuale Anteil an Partikeln pro μm^2 Zellfläche der Deletionsmutante bei 49 % (photoautotrophes Wachstum) bzw. 8 % (mixotrophes Wachstum) der entsprechenden Werte in den *Synechocystis* Wildtypzellen.

Die Partikel, die nach Immuno-Gold-Labeling unter Verwendung des α -KaiC3-Antikörpers detektiert wurden, traten im *Synechocystis* Wildtyp teilweise in Grüppchen, aber auch einzeln, auf. Diese Anhäufung erschien in der Mutante weniger ausgeprägt, war aber ebenso vorhanden. Abgesehen davon schienen die Partikel über die gesamte Zellfläche verteilt zu sein. Es wurde keine diskrete Lokalisation in bestimmten Zellarrealen, wie z. B. an den Zellpolen, beobachtet. Gleiches galt für die mit α -KaiA-Serum inkubierten Dünnschnitte. Die Partikel waren nicht in bestimmten Zellarrealen konzentriert (Abbildung 2-19 und Abbildung 2-20).

Unabhängig davon war eine grobe Einteilung in cytosolische und membranständige Partikel möglich: Laut Hermann und Kollegen [217] können Goldpartikel, die mit einem sekundären Antikörper konjugiert sind, 15-30 nm vom Antigen des Primärantikörpers entfernt liegen. Die Lage der Goldpartikel gab folglich nicht die exakte Position von KaiA₆₈₀₃ und KaiC3 an, sondern definierte einen Umkreis um die Proteine. Um die Verteilung der Kai-Proteine in der Zelle aus den TEM-Bildern abzuschätzen, wurden darum alle Partikel, die auf den Thyalkoidmembranen oder der Cytoplasmamembran bzw. bis zu 15 nm entfernt davon detektiert wurden, dem entsprechenden Membransystem zugeordnet. Alle verbliebenen Partikel wurden dagegen als cytosolisch klassifiziert. Dieses sehr strenge Kriterium sollte vermeiden, dass cytosolische Proteine fälschlich als membranassoziiert gewertet werden, führte aber vermutlich zu einer Unterbewertung der membranständigen Proteine. Entsprechend dieser Einteilung

wurden nach Inkubation mit α -KaiA- und α -KaiC3-Serum Proteine an den Thylakoidmembranen (schwarze Pfeile mit weißem Rahmen in Abbildung 2-19 und Abbildung 2-20), im Cytosol (weiße Pfeile mit schwarzem Rahmen in Abbildung 2-19 und Abbildung 2-20) und zu geringem Anteil an der Cytoplasmamembran (exemplarisch in Abbildung 2-20) detektiert. In Abbildung 2-21 ist die prozentuale Verteilung in 6-21 Zelldünnschnitten wiedergegeben, in denen die Lokalisation der Partikel zugeordnet werden konnte. Zellen, in denen gar keine Partikel detektiert wurden, sind dabei nicht berücksichtigt:

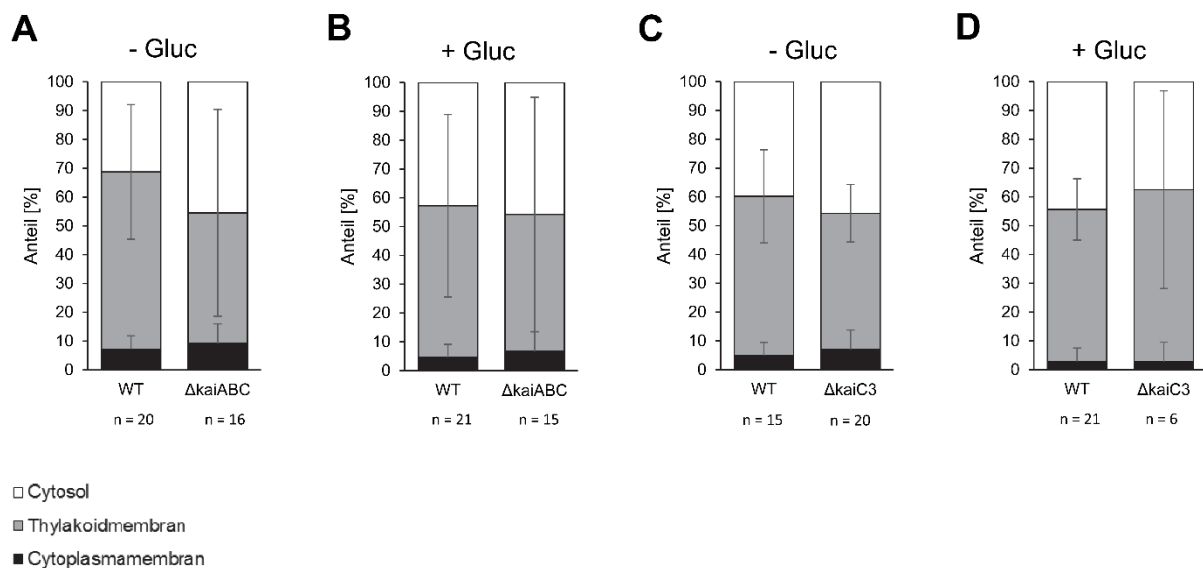


Abbildung 2-21. Relative Verteilung der Goldpartikel nach Immuno-Gold-Labeling mit α -KaiA- und α -KaiC3-Serum. - KaiA₆₈₀₃ und KaiC3 befanden sich bei photoautotrophem und mixotrophem Wachstum an den Thylakoidmembranen und im Cytosol. *Synechocystis* Wildtyp (WT), *Synechocystis* Δ kaiABC (Δ kaiABC) und *Synechocystis* Δ kaiC3 (Δ kaiC3) wurden photoautotroph (- Gluc) und mixotroph (+ Gluc) in LD kultiviert, einem Immuno-Gold-Labeling mit dem α -KaiA- bzw. α -KaiC3-Antikörper unterzogen und durch TEM analysiert (siehe auch Abbildung 2-19 und Abbildung 2-20). Anschließend wurden die Partikel in 6-20 Zellen gezählt und ihre Lokalisation definiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der prozentualen Anteile der Partikel im Cytosol (weiß), an den Thylakoidmembranen (grau) und an der Cytoplasmamembran (schwarz) bezogen auf die Gesamtpartikelzahl pro Zelle. Der obere Fehlerbalken kennzeichnet die Standardabweichung des prozentualen Partikelanteils an den Thylakoidmembranen; der untere Fehlerbalken die Standardabweichung des prozentualen Partikelanteils an der Cytoplasmamembran. Die Anzahl der eingeflossenen Replikate (n) ist unter den Diagrammen angegeben. **A.** Analysen mit α -KaiA-Serum nach photoautotrophem Wachstum. **B.** Analysen mit α -KaiA-Serum nach mixotrophem Wachstum. **C.** Analysen mit α -KaiC3-Serum nach photoautotrophem Wachstum. **D.** Analysen mit α -KaiC3-Serum nach mixotrophem Wachstum.

Nach Inkubation mit α -KaiA-Serum wurden im photoautotroph kultivierten *Synechocystis* Wildtyp ca. 62 % der Partikel an der Thylakoidmembran detektiert. Berücksichtigt man, dass etwa 32 % dieser Partikel ein anderes Protein als KaiA₆₈₀₃ repräsentierten (s.o.), das in *Synechocystis* Δ kaiABC nur zu 45 % an der Thylakoidmembran lokalisiert war, erhöht sich der Anteil thylakoidassoziierten KaiA₆₈₀₃ sogar auf 70 % (zur Berechnung siehe 4.2.3.13.5). Bei

Wachstum in Anwesenheit von 0,2 % Glucose wurden im *Synechocystis* Wildtyp geringfügig weniger, in *Synechocystis* $\Delta kaiABC$ indes etwas mehr membranständige Partikel detektiert. Nach Verrechnung der Partikelzahlen in Wildtyp und Mutante entspräche dies einem Anteil von etwa 56 % thylakoidassoziiertem KaiA₆₈₀₃. Nur 6 % (photoautotrophes Wachstum) bzw. 3 % (mixotrophes Wachstum) des KaiA₆₈₀₃ lokalisierte, laut vergleichbarer Berechnungen, an der Cytoplasmamembran. Ob diese geringen Werte von biologischer Relevanz sind, ist fraglich. Insgesamt erhärten die TEM-Analysen den bereits bei der Westernblot-Analyse (Abbildung 2-18) gewonnenen Eindruck, dass sowohl bei photoautotrophem als auch mixotrophem Wachstum der überwiegende Teil von KaiA₆₈₀₃ an der Thylakoidmembran vorlag, dieser Anteil bei mixotrophem Wachstum aber leicht reduziert wurde.

Vergleichbare Befunde ergab die Auswertung der TEM-Aufnahmen nach Immuno-Gold-Labeling unter Verwendung des α -KaiC3-Serums. Unter Berücksichtigung der Partikelzahl und Verteilung in *Synechocystis* Wildtyp und *Synechocystis* *kaiC3*-Deletionsmutante wurden nach photoautotrophem Wachstum etwa 62 % des KaiC3 an den Thylakoidmembranen gefunden. Bei mixotrophem Wachstum verringerte sich der Anteil thylakoidassoziierten KaiC3 auf 52 %. Erneut lagen nur ca. 3 % des KaiC3 an der Cytoplasmamembran vor, was als nicht biologisch relevant betrachtet wurde.

2.2.3.5.4 Lokalisation von KaiC1

Die Ultradünnschnitte des *Synechocystis* Wildtyp und der *Synechocystis* *kaiABC*-Deletionsmutante, die zur Analyse der Verteilung von KaiA₆₈₀₃ in der Zelle präpariert worden waren (Abschnitt 2.2.3.5.3), dienten auch der genaueren Lokalisation von KaiC1 durch Immuno-Gold-Labeling und TEM. Nach Inkubation mit α -KaiC1-Serum und dem Goldgelabelten Sekundärantikörper wurden in photoautotroph kultivierten *Synechocystis* Wildtyp-Zellen nur ca. $1,9 \pm 1,5$ Goldpartikel pro μm^2 Zellfläche detektiert (Abbildung 2-22). In der Deletionsmutante lagen im Schnitt etwa 30 % der Partikel vor. Folglich interagiert der α -KaiC1-Antikörper auch mit zusätzlichen Proteinen in *Synechocystis*. In sechs der neun bildlich dargestellten *Synechocystis* $\Delta kaiABC$ -Zellen wurden jedoch keine Partikel gefunden und die Partikelzahlen in Wildtyp und Deletionsmutante war laut eines Zwei-Stichproben t-Tests signifikant unterschiedlich ($p = 0,02$). Ob die gewonnen Resultate in Anbetracht der allgemein geringen Partikelzahl in den Zellen, des geringen Stichprobenumfangs der Kontrolle und der Tatsache, dass vergleichbar viele Partikel außerhalb der Zelle detektiert wurden, tatsächlich von biologischer Signifikanz sind, gilt es zu klären.

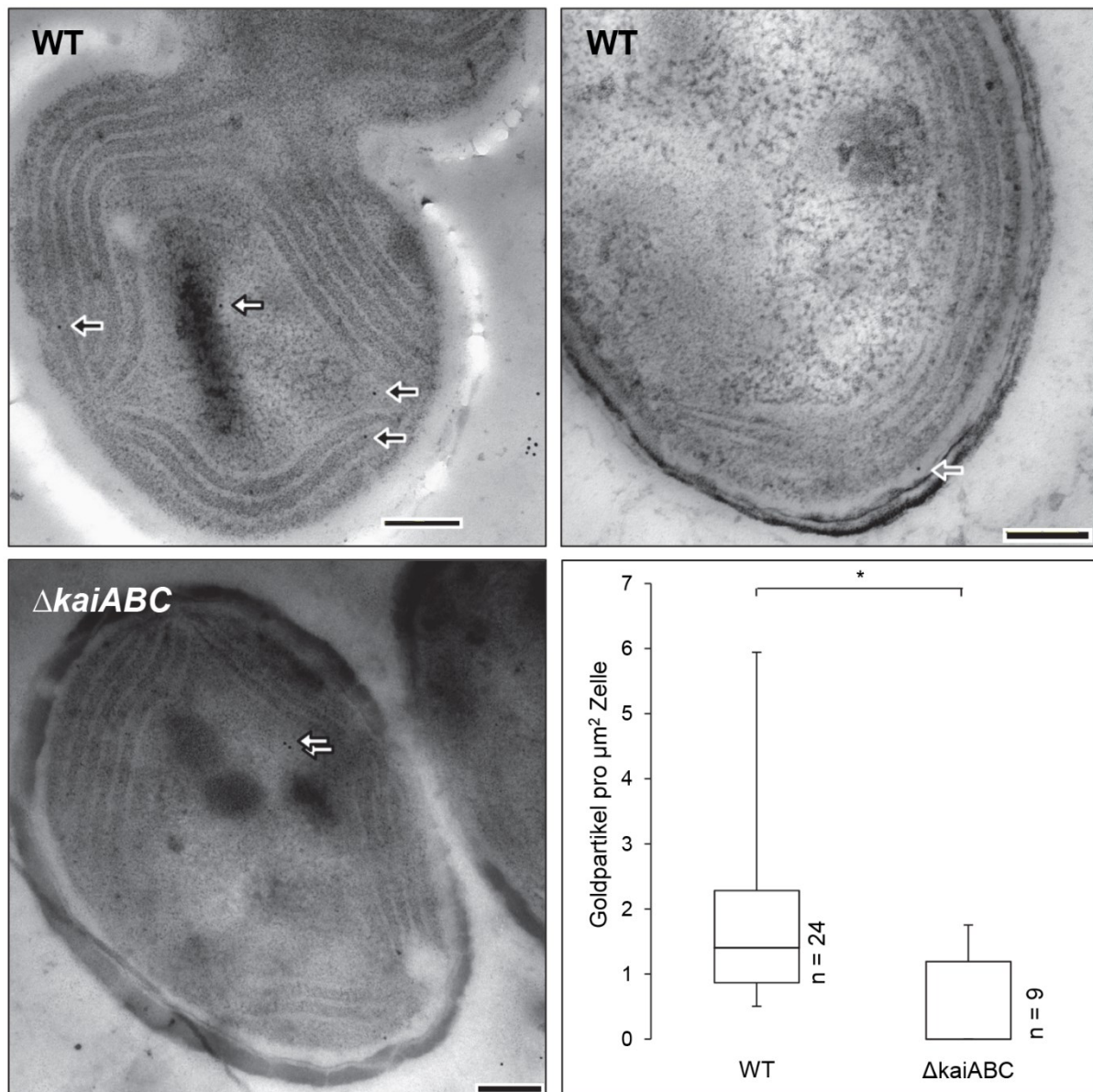


Abbildung 2-22. TEM-Aufnahmen nach Immuno-Gold-Labeling zur Lokalisation von KaiC1. – KaiC1 wurde im Cytosol, an den Thylakoidmembranen und an der Cytoplasmamembran detektiert. – *Synechocystis* Wildtyp und *Synechocystis* $\Delta kaiABC$ wurden photoautotroph in LD kultiviert und Zellen in der Mitte der Nacht (ZT 17,5) geerntet, fixiert und später dehydriert. Dünnschnitte der in *LR white* polymerisierten Zellen wurden einem Immuno-Gold-Labeling unter Verwendung des α -KaiC1-Antikörpers unterzogen. Nach Färbung durch Uranyl-Acetat und Blei-Citrat wurden die Dünnschnitte elektronenmikroskopisch untersucht und die enthaltenen Goldpartikel gezählt. Oben sind zwei exemplarische Aufnahmen der *Synechocystis* Wildtyp-Zellen (WT), unten ein exemplarischer Zelldünnschnitt aus *Synechocystis* $\Delta kaiABC$ ($\Delta kaiABC$) dargestellt. Schwarze Pfeile mit weißem Rahmen markieren Goldpartikel an den Thylakoidmembranen, der graue Pfeil mit weißem Rahmen einen Goldpartikel an der Cytoplasmamembran und weiße Pfeile mit schwarzem Rahmen Goldpartikel im Cytosol. Der Größenbalken entspricht 200 nm. Die Box-Whisker-Plots geben die Mediane sowie den Interquartilsabstand zwischen dem 1. und 3. Quartil der detektierten Partikel pro μm^2 Zellfläche an. Die Whisker kennzeichnen die Spannweite zwischen den minimalen und maximalen Werten. (Der Median, das untere Quantil und der Minimalwert der Partikel in den *Synechocystis* $\Delta kaiABC$ -Zellen lagen bei 0). Neben den Boxen ist die Zahl der berücksichtigten Zellquerschnitte (n) genannt. In einem Zwei-Stichproben t-test, erwiesen sich die gemessenen Partikelzahlen pro μm^2 Zelle in *Synechocystis* Wildtyp und *Synechocystis* $\Delta kaiABC$ als signifikant unterschiedlich (*, $p < 0,05$).

Dem ungeachtet war auffällig, dass in einem Viertel der untersuchten *Synechocystis* Wildtyp-Zellen Proteine an der Cytoplasmamembran gefunden wurden (exemplarisch oben rechts in Abbildung 2-22 dargestellt), während in den Zellquerschnitten von *Synechocystis* Δ kaiABC keine Partikel in ausreichend räumlicher Nähe zur Cytoplasmamembran vorkamen. Der Anteil der Proteine, die an der Cytoplasmamembran gefundenen wurden, betrug im *Synechocystis* Wildtyp ca. 13,6 %. Die restlichen Partikel waren zu etwa 37,2 % bzw. 49,2 % an den Thylakoidmembranen bzw. im Cytosol lokalisiert (exemplarisch oben links in Abbildung 2-22 dargestellt). Abgesehen von zwei Ausnahmen lagen die detektierten Proteine jedoch in 22 eindeutig auswertbaren Zellen nicht gleichzeitig an allen drei möglichen Lokalisationsorten vor. In *Synechocystis* Δ kaiABC wurden in zwei der neun analysierten Zellen cytosolische Proteine (exemplarisch dargestellt in Abbildung 2-22) und nur in einer Zelle Proteine an den Thylakoidmembranen durch Goldpartikel markiert.

Bei vergleichbaren Untersuchungen der mixotroph kultivierten Zellen wurden nicht ausreichend viele Goldpartikel in den mit α -KaiC1-Serum inkubierten Zellquerschnitten gefunden, um Aussagen über die Lokalisation von KaiC1 zu treffen (nicht gezeigt).

Da bei Westernblot-Analysen mit dem α -KaiC2-Antikörper neben KaiC2 stets eine zweite Proteinbande mit vergleichbarer Signalintensität detektiert wurde (siehe z. B. Abbildung 2-14), wurde auf ein Immuno-Gold-Labeling zur genauen Lokalisation von KaiC2 verzichtet. Eine Unterscheidung zwischen KaiC2 und dem prominenten unbekannten Protein wäre auch mangels einer *Synechocystis* kai2B2-Deletionsmutante nicht möglich gewesen. Eine TEM-Analyse des kai2B2-Überexpressors schien zudem nicht sinnvoll, da die Lokalisation des KaiC2 aufgrund der verstärkten Expression verändert sein könnte.

2.2.3.5.5 Abundanz von KaiA₆₈₀₃ und KaiC3 bei photoautotrophem und mixotrophem Wachstum

Die TEM-Analysen suggerierten, dass bei Wachstum in Anwesenheit von 0,2 % Glucose weniger KaiA₆₈₀₃- und KaiC3-Moleküle in den Zellen vorhanden waren als in Abwesenheit organischer Kohlenstoffquellen im Medium (vergleiche Abbildung 2-19 und Abbildung 2-20). Darum wurde der KaiA₆₈₀₃- und KaiC3-Gehalt in zeitgleich aus denselben Kulturen gewonnenen Gesamtzellextrakten (ZT 17,5; Abschnitt 2.2.3.5.1) durch Westernblotting und eine darauffolgende Immuno-Detektion untersucht (Abbildung 2-23). Für die Verdünnungsreihen der „Nacht-Proben“ wurden Bereiche ermittelt, in denen eine lineare

Antikörperbindung gegeben war und die Menge des jeweils untersuchten Kai-Proteins anhand einer Kalibrierungsgerade abgeschätzt, welche mithilfe einer Verdünnungsreihe rekombinanten KaiA₆₈₀₃ bzw. KaiC3 erstellt wurde. Der Gesamtzellextrakt aus den Zellen der Kultur, die photoautotroph unter kontinuierlicher Belichtung angezogen worden war (Abschnitt 2.2.3.3), diente zum Vergleich.

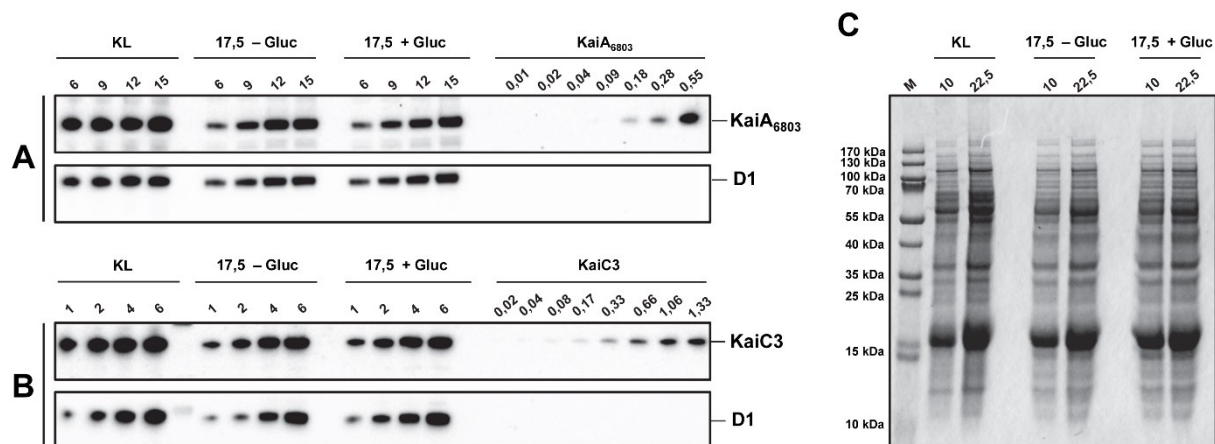


Abbildung 2-23. Abundanz von KaiA₆₈₀₃ und KaiC3 bei photoautotrophen und mixotrophen Wachstum in LD. – Die Proteine waren unter beiden Bedingungen etwa gleich stark exprimiert. *Synechocystis* wurde photoautotroph (- Gluc) oder mixotroph (+ Gluc) in LD (Abschnitt 2.2.3.5.1) sowie photoautotroph unter Dauerbelichtung (KL, Abschnitt 2.2.3.3) angezogen und Zellen in der Mitte der Nacht (17,5 in LD) bzw. in der exponentiellen Wachstumsphase (KL) geerntet. **A.** Verdünnungsreihen der daraus gewonnenen Gesamtzellextrakte mit 6-15 µg Gesamtprotein wurden auf ein PAA-Gel aufgeladen und im Vergleich zu einer seriellen Verdünnung rekombinanten KaiA₆₈₀₃ (0,01-0,55 ng, gerundete Werte) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde diese zunächst mit α -KaiA-Serum und einem sekundären, mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Antikörper inkubiert (oben). Nach der Detektion der Chemilumineszenzsignale wurden die Antikörper von der Membran *gestrippt* und eine Immuno-Detektion mit α -D1-Serum durchgeführt (unten). **B.** Analog wurden Gesamtzellextrakte mit 1-6 µg Protein im Vergleich zu einer Verdünnungsreihe rekombinanten KaiC3 (0,02-1,33 ng, gerundete Werte) untersucht. Nach Trennung der Proteine durch SDS-PAGE und dem Elektrottransfer auf eine Membran wurden KaiC3 (oben) und D1 (unten) mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. **C.** Zur Kontrolle der Proteinbestimmung wurden Gesamtzellextrakte mit je 10 und 22,5 µg Protein auf ein PAA-Gel aufgetragen und die durch Elektrophorese separierten Proteine mit Coomassie gefärbt.

Bei dieser einmaligen Analyse ergab sich nach photoautotrophen Wachstum ein KaiA₆₈₀₃-Gehalt von ca. 0,05 ng pro Mikrogramm Gesamtprotein. Unter Berücksichtigung des Gesamtproteingehalts zu ZT 17,5 (siehe Tabelle 2-1) lässt sich daraus eine KaiA₆₈₀₃-Konzentration von ca. 0,1 fg pro Zelle berechnen, was etwa 2.100 KaiA₆₈₀₃-Molekülen entspricht. Bei mixotrophen Wachstum wurden 1.900 Moleküle KaiA₆₈₀₃ pro Zelle detektiert. KaiC3 lag nach photoautotrophen Wachstum mit 2,9 fg oder ca. 30.700 Molekülen in der Zelle vor. Nach Kultivierung in Anwesenheit von 0,2 % Glucose wurden etwa 3,6 fg bzw. ca. 38.100 Moleküle pro Zelle gefunden. In Übereinstimmung mit der in Abbildung 2-18 dargestellten Fraktionierung der Gesamtzellextrakte konnte demnach kein deutlicher Unterschied des

KaiA₆₈₀₃- und KaiC3-Gehalts pro Zelle bei photoautotrophem und mixotrophem Wachstum detektiert werden. Folglich waren die Differenzen bei den TEM-Analysen nicht von biologischer Bedeutung. Stattdessen resultierten sie vermutlich daraus, dass das Zellmilieu bei mixotrophem Wachstum und folglich auch die Infiltration mit *LR white* und spätere Antikörperbindung verändert war. Die Westernblot-Studien bestätigten noch einmal, dass KaiA₆₈₀₃ und KaiC3 - wie bereits bei den relativen Quantifizierungen über 48h beobachtet (Abbildung 2-16) - im Dauerlicht abundanter vorliegen als in LD.

Eine vergleichbare Analyse von Zellen, die zur Stunde 17,5 im Rahmen des LDLL-Experiments (2.2.3.1) geerntet worden waren, lieferte Molekülzahlen in der gleichen Größenordnung (ca. 3.800 Moleküle KaiA₆₈₀₃ und ca. 18.000 Moleküle KaiC3). Für eine exakte Bestimmung wären weitere Wiederholungen nötig, bei denen die rekombinanten Proteine und Gesamtzellextrakte so eingesetzt werden sollten, dass sich vergleichbare Signalintensitäten ergeben. Für diese Arbeit soll eine Einschätzung der groben Molekülzahl jedoch ausreichen.

2.2.3.6 *In vivo* Phosphorylierung der KaiC-Proteine

Aufgrund der bisherigen Analysen war nun bekannt, dass die drei KaiC-Proteine in *Synechocystis* unter diurnalen und circadianen Bedingungen nahezu konstant und zum Großteil membranassoziiert vorliegen. In Anbetracht der Tatsache, dass die circadianen Oszillationen in *Synechococcus* durch die Phosphorylierungszyklen des KaiC₇₉₄₂ getrieben werden und diese Zyklen unter nahezu allen Umgebungsbedingungen fortbestehen (siehe Einleitung, Abschnitt 1.3.1), stellte sich die Frage ob die KaiC-Proteine auch in *Synechocystis* phosphoryliert vorliegen. KaiC1 und KaiC3, denen von Aoki und Onai eine Rolle in der Generierung circadianer Rhythmen in *Synechocystis* zugeschrieben wurde [196], waren hier von besonderem Interesse.

Vor diesem Hintergrund wurden Gesamtzellextrakte, die während des LDLL-Experiments (siehe 2.2.3.1) gewonnen worden waren, auf hoch auflösende PAA-Gele geladen und die Proteine elektrophoretisch separiert. Im Rahmen einer Westernblot-Analyse konnten mit den α -KaiC1- und α -KaiC3-Antikörpern anschließend nur diffuse Banden detektiert werden (Abbildung 2-24.A). Der Vergleich mit einem Gesamtzellextrakt (siehe 2.2.3.3), in dem potenzielle Phosphatreste an KaiC1 und KaiC3 durch eine Lambda-Protein-Phosphatase entfernt wurden, ließ vermuten, dass beide Proteine vorwiegend dephosphoryliert vorlagen.

Aufgrund der geringen Auflösung der Banden war eine eindeutige Aussage jedoch nicht möglich.

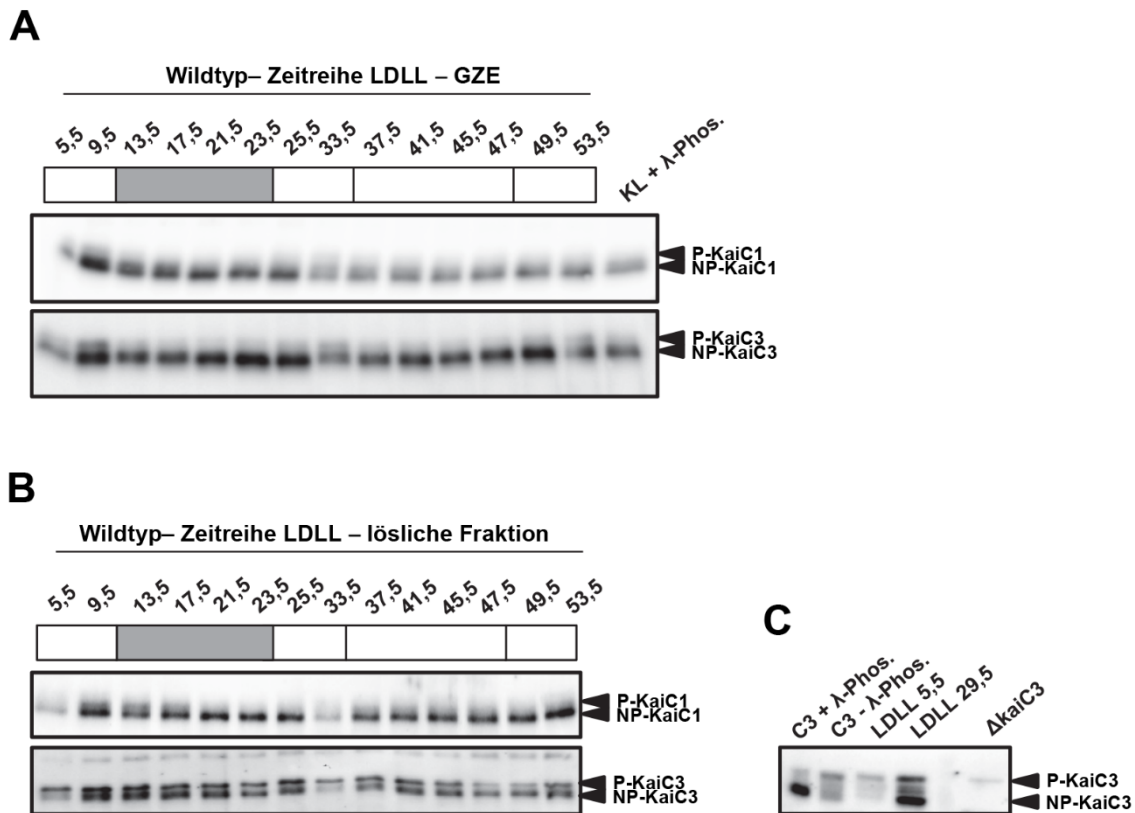


Abbildung 2-24. Untersuchungen zur Phosphorylierung von KaiC1 und KaiC3 in der Zelle. - Die Phosphorylierungsstufen ließen sich nicht zweifelsfrei darstellen. **A.** Gesamtzellextrakte (GZE) aus dem LDLL-Experiment wurden auf den Proteingehalt normiert (je 4 µg für KaiC1-Detektion, je 3 µg für KaiC3-Detektion) und in einem PAA-Gel mit 11 % T und 0,67 % C sowie einer Laufstrecke von ca. 8 cm aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde ein Gesamtzellextrakt aus der unter kontinuierlicher Belichtung gewachsenen Kultur (KL) für 2,5 Stunden mit 20 Units Lambda-Protein-Phosphatase pro µg Gesamtprotein inkubiert und die gleiche Proteinmenge (4 µg bzw. 3 µg) separiert. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde diese im Rahmen einer Immundetektion mit α-KaiC1- (oben) und α-KaiC3-Serum (unten) inkubiert. **B.** Die Membranbestandteile und daran assoziierte Proteine wurden aus den Gesamtzellextrakten eines anderen biologischen Replikats der LDLL-Zeitreihe entfernt. Anschließend wurde die lösliche Fraktion in einem PAA-Gel (11 % T, 0,67 % C) mit ca. 15 cm Laufstrecke aufgetrennt. Dabei wurden Volumina verwendet, die mit 30 µg (KaiC1) bzw. 20 µg (KaiC3) Gesamtprotein im Gesamtzellextrakt korrelierten. Anschließend erfolgte eine Westernblot-Analyse unter Verwendung von α-KaiC1- (oben) und α-KaiC3-Serum (unten). **C.** Zur Kontrolle wurde rekombinantes KaiC3 (Abschnitt 2.2.2.1) einmal in Anwesenheit von 40 U µl⁻¹ Lambda-Protein-Phosphatase (C3 + λ-Phos.) und einmal ohne Enzym (C3 - λ-Phos.) inkubiert. Jeweils 160 ng des so behandelten Proteins wurden im Vergleich mit den cytosolischen Proteinen in zwei Extrakten des LDLL-Experiments (LDLL 5,5 und LDLL 29,5) sowie löslichen Proteinen in *Synechocystis* Δ*kaiC3* (Δ*kaiC3*) aufgetrennt. Die löslichen Fraktionen wurden dabei auf das Volumen normalisiert, das mit 24 µg Protein im Gesamtzellextrakt korrelierte. Anschließend erfolgte der Elektrotransfer der separierten Proteine auf eine PVDF-Membran und eine Immundetektion mit dem α-KaiC3-Antikörper. P-KaiC1 und NP-KaiC1 (bzw. P-KaiC3 und NP-KaiC3) markieren Banden, die vermutlich phosphoryliertes und dephosphoryliertes KaiC repräsentieren.

Da der überwiegende Teil der KaiC-Proteine membranassoziiert vorlag, wurden lösliche und Membranproteine fraktioniert und getrennt analysiert. In der Membranfraktion waren KaiC1 und KaiC3 enthalten, bei beiden Proteinen konnte jedoch erneut nicht mehr als eine Bande

aufgelöst werden (nicht gezeigt). Nach Separation der löslichen Proteine und Detektion mit dem entsprechenden Antikörper erschien KaiC1 wieder primär dephosphoryliert, obgleich bei der hier gezeigten, einmaligen Analyse Unterschiede in der Phosphorylierung zu erahnen waren (vergleiche z.B. ZT 9,5 und ZT 23,5 in Abbildung 2-24.B). Aufgrund der schlechten Auflösung wurden potenzielle zeitliche Veränderungen jedoch nicht weiter verfolgt. Der KaiC3-Antikörper detektierte in der löslichen Fraktion zwei distinkte Banden, die bei einer unabhängigen Kontrollanalyse genau auf Höhe des rekombinanten KaiC3s (zur Reinigung siehe auch 2.2.2.1) lagen. Durch Inkubation mit einer Lambda-Protein-Phosphatase konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der oberen Bande um phosphoryliertes, bei der unteren Bande um dephosphoryliertes rekombinantes KaiC3 handelte (Abbildung 2-24.A, siehe auch 2.2.2.4). Der α -KaiC3-Antikörper detektierte allerdings auch im löslichen Extrakt von *Synechocystis* Δ kaiC3 ein unbekanntes Protein auf Höhe des phosphorylierten KaiC3. Vermutlich war dieses durch die Trennung von membranassoziierten und löslichen Proteinen im Verhältnis zu KaiC3 deutlich angereichert worden. Da das Verhalten dieses Proteins in LD unbekannt ist, konnte nicht abgeschätzt werden in welchem Ausmaß das Bandenmuster im *Synechocystis* Wildtyp durch die Überlagerung von phosphoryliertem KaiC3 und unbekanntem Protein beeinflusst wurde. Es sei angemerkt, dass die untere Bande zum Zeitpunkt 5,5 und 33,5 in zwei biologischen Replikaten der LDLL-Reihe wiederholt weniger abundant war, dieser Trend in löslichen Extrakten einer unabhängig in LD angezogenen Kultur aber nicht bestätigt werden konnte. Die Veränderungen in der LDLL-Reihe könnten daher auch auf dem etwas geringeren Gesamt-KaiC1- und KaiC3-Gehalt zu ZT 5,5 und 33,5 basieren (vergleiche Abbildung 2-16).

Zusammenfassend konnten keine deutlichen Phosphorylierungsrhythmen des KaiC1 und KaiC3 in *Synechocystis* detektiert werden. Dennoch suggerierten die Analysen, dass KaiC1 und KaiC3 vermutlich zum Teil in phosphorylierter Form in der Zelle vorlagen, was die *in vitro* detektierte Kinase-Aktivität bestätigte. Darüber hinaus wurde demonstriert, dass KaiA, KaiC1, KaiC2 und KaiC3 konstant und größtenteils membranassoziiert in der Zelle vorliegen. Dabei treten KaiA und KaiC1 vorwiegend an den Thylakoidmembranen auf. KaiC1 könnte zudem an der Cytoplasmamembran vorliegen.

3. Diskussion

3.1 Der *Synechococcus* PTO – Untersuchungen zum KaiC-KaiB-Komplex⁷

Die zyklische Phosphorylierung und Dephosphorylierung des KaiC-Proteins fungiert als Kern der circadianen Uhr in *Synechococcus* und steuert die rhythmische Aktivität der Zellen. Zur Generierung der Phosphorylierungsrhythmen ist der antagonistische Einfluss von KaiB auf die Stimulation der KaiC-Phosphorylierung durch KaiA essenziell [60,63,92]. Zudem inhibiert KaiB die ATPase-Aktivität von KaiC [81] und stützt die Synchronisierung der Dephosphorylierung [64,84,99,101,108-111,114,115]. Wie KaiB die Verschiebung der Reaktionsgleichgewichte erzielt und strukturell zur Ausbildung der KaiA-Sequestrierungsbindestelle bzw. Förderung des KaiC-Monomeraustauschs beiträgt, war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Nachdem längere Zeit weitestgehend einvernehmlich angenommen wurde, KaiB binde an den CII-Ring von KaiC, wurde der Ort der Bindung in den letzten Jahren kontrovers diskutiert (zusammengefasst von Egli [201]). Darum galt es, weitere strukturelle Informationen zur KaiC-KaiB-Komplexbildung zu sammeln. Vor diesem Hintergrund wurde die Interaktion der beiden Proteine im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Albert J. R. Heck (*Utrecht University* und *Netherland Proteomics Centre*, Utrecht, Niederlande) untersucht. Die Wildtyp-Proteine KaiC und KaiB wurden erfolgreich in hoch reiner Form präpariert (siehe auch 2.1), ihre Aktivität verifiziert (4.2.3.15.2) und dann für weiterführende massenspektrometrische Experimente an die Kooperationspartner weitergegeben. Alle massenspektrometrischen Analysen wurden von Joost Snijder (*Utrecht University* und *Netherland Proteomics Centre*, Utrecht, Niederlande) durchgeführt und ausgewertet. Im Zusammenhang mit den in Abschnitt 2.1 dargestellten Untersuchungen konnten so wertvolle Detailinformationen zur Phosphorylierung des KaiC sowie Stöchiometrie und Struktur des KaiC-KaiB-Komplexes gewonnen werden, die in *Proc Natl Acad Sci USA* veröffentlicht sind [203]. Entscheidend war, dass eine Bedingung etabliert wurde, die die Untersuchung von KaiC-KaiB-Komplexen unter Verwendung der Wildtyp-Proteine erlaubt.

⁷ Da sich die in Abschnitt 3.1 diskutierten Ergebnisse und Literaturdaten vorwiegend auf die Kai-Proteine aus *Synechococcus* und *Thermosynechococcus* beziehen, wird der Übersichtlichkeit halber auf eine exakte Benennung (z. B. KaiA₇₉₄₂, KaiB₇₉₄₂ und KaiC₇₉₄₂) verzichtet. Stattdessen sind die Ausführungen als allgemeine Betrachtung des cyanobakteriellen Standardoszillators zu verstehen.

3.1.1 KaiC bildet bei 4 °C aufgrund der erhöhten Phosphorylierung stabile Komplexe mit KaiB

In dieser Arbeit wurden nach Inkubation der drei Kai-Proteine aus *Synechococcus* bei 30 °C nur wenige KaiC-KaiB-Komplexe detektiert (Abbildung 2-1). Das Laufverhalten der einzelnen Proteine und Komplexe im nativen PAA-Gel war dabei mit zuvor publizierten Daten vergleichbar [99,102,218]. Die Befunde bestätigen, dass Im Laufe eines *in vitro* Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungszyklus bei Standardtemperaturen maximal 20-50 % der KaiC- und 30-40 % der KaiB-Proteine miteinander zu interagieren scheinen [84,113]. Durch den geringen Anteil interagierender Proteine unter den Bedingungen, die üblicherweise zur Erzeugung der *in vitro* Oszillationen verwendet werden, wird die Analyse des KaiC-KaiB-Komplexes erschwert. Mit der einwöchigen Inkubation von KaiC und KaiB bei 4 °C wurde hier dagegen erfolgreich eine Bedingung etabliert, die zur vermehrten Bildung stabiler KaiC-KaiB-Komplexe führt (Abschnitt 2.1). Die verstärkte Komplexbildung bei niedrigen Temperaturen wurde von Joost Snijder auch durch native MS-Analysen belegt [203]. Diese äußerst sensitive Methode erlaubt die Untersuchung nativer Quartärstrukturen [219-225]. So wurden z.B. die Struktur und Stöchiometrie des 20S-Proteasoms aus verschiedenen Organismen, der RNA-Polymerase II und III aus Hefe, des bakteriellen Ribosoms sowie des Antennenkomplexes grüner Schwefelbakterien charakterisiert [219-221,225] und die Oligomerisierung des cyanobakteriellen OCP (für engl. *orange carotinoid protein*) nach Photoaktivierung in Echtzeit verfolgt [226]. Die nativen MS-Analysen der KaiC-KaiB-Komplexe zeigten interessanterweise stöchiometrische Unterschiede bei den zwei gewählten Temperaturen [203]: Nach Inkubation unter Standardbedingungen wurden KaiC-Hexamere mit sechs gebundenen KaiB-Molekülen (C6B6) sowie eine kleine Fraktion von Komplexen aus sechs KaiC-Monomeren und einem KaiB-Molekül (C6B1) detektiert. Nach der verlängerten Inkubation bei 4 °C wiesen alle Komplexe eine „1:1-Stöchiometrie“ von sechs KaiB- und sechs KaiC-Molekülen auf. Aufgrund dieser Messungen lässt sich ein Modell aufstellen, nach welchem KaiB als Monomer an das KaiC-Hexamer bindet. Da nur C6B1- und C6B6-Komplexe gefunden wurden, kann zudem angenommen werden, dass die Bindung kooperativ erfolgt: Die Assoziation eines KaiB-Monomers erleichtert vermutlich die Bindung weiterer KaiB-Monomere derart, dass diese in einer Art „Alles-oder-Nichts“-Weise die restlichen fünf Bindestellen des KaiC-Hexamers zeitgleich besetzen [203].

Die Phosphorylierung des KaiC ist ein gerichteter Prozess. Es wird immer zuerst KaiC^{S/pT} und erst danach KaiC^{pS/pT} erzeugt. Bei der Dephosphorylierung stellt KaiC^{pS/T} die Zwischenform auf dem Weg zu KaiC^{S/T} dar ([76,85,86,88], siehe auch Abschnitt 1.3.2.2). Vor diesem Hintergrund wurde hier anhand des durch Gelanalysen ermittelten Phosphorylierungsgrads (ca. 70-80 %) sowie der Detektion von KaiC^{pS/pT} als abundanteste Phosphorylierungsform eindeutig gezeigt, dass unabhängig von KaiB die Kinase-Aktivität des KaiC bei 4 °C dominierte. Die niedrige Gesamtposphorylierung (ca. 30 %) und Dominanz von KaiC^{S/T} und KaiC^{pS/T} wies hingegen auf eine Dephosphorylierung bei 30 °C hin (Abbildung 2-2). Diese temperaturabhängige Verlagerung des Gleichgewichts zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung wird durch die Literatur gestützt: Nachdem schon länger bekannt war, dass die Dephosphorylierung des KaiC in Abwesenheit von KaiA und KaiB bei 30 °C begünstigt ist ([70,90-92,95,110]), wurde in den letzten Jahren mehrfach berichtet, dass KaiC nach Inkubation bei 4 °C ohne KaiA und KaiB phosphoryliert vorliegt [78,90,99,110]. Dass die Anwesenheit von KaiB in den hier dargestellten Analysen keinen Einfluss auf die gesteigerte Kinase-Aktivität von KaiC hatte, bestätigt, dass KaiB das Gleichgewicht zur Dephosphorylierung nur als Gegenpol von KaiA einleiten kann [60,92]. Nach einer Hypothese von Egli und Kollegen beruht die gesteigerte Phosphorylierung bei 4 °C auf einer temperatur-bedingten Schwächung hydrophober Wechselwirkungen und der darauf beruhenden inter- und intramolekularen Interaktionen, welche die *A-Loops* in der geborgenen Konformation halten [70]. Eine Stabilisierung der *A-Loops* in der exponierten Konformation durch KaiA ist dadurch nicht mehr nötig und KaiB kann selbst in Anwesenheit von KaiA keinen Effekt auf die KaiC-Phosphorylierung mehr ausüben (nicht gezeigte Daten und [64]).

Aufgrund der durch native MS ermittelten Masse der Kai-Komplexe konnte in Ergänzung zu meinen Gelanalysen (2.1) berechnet werden, dass in den KaiC-Hexameren mit sechs gebundenen KaiB-Monomeren sowohl bei 4 °C als auch bei 30 °C über 70 % der maximal möglichen Phosphatreste vorlagen. In den C6B1-Komplexen, die nach Inkubation bei 30 °C detektiert wurden, waren hingegen durchschnittlich nur ca. 39 % der möglichen zwölf Phosphatreste vorhanden. Bei den KaiC-Hexameren, die trotz Inkubation mit KaiB keine Interaktion eingingen, waren sogar nur 20 % der Phosphorylierungsstellen besetzt [203]. Die zwei unabhängigen Analysen der Phosphorylierung (SDS-PAGE und MS) bestätigen eindeutig, dass KaiB bevorzugt an phosphoryliertes KaiC bindet [84,85]. Zur genaueren Analyse der Bindung von KaiB an KaiC wurden bislang bevorzugt KaiC-Mutanten eingesetzt, die bestimmte Phosphorylierungszustände simulieren [84-86,99,103,199]. Die Interaktion mit

Mutanten, welche KaiC^{S/pT} imitieren, ist ähnlich gering wie die mit dephosphoryliertem KaiC bzw. KaiC-AA [84,103,199]. Dagegen bilden sowohl die KaiC^{pS/T} als auch KaiC^{pS/pT} simulierenden Varianten stabile Komplexe mit KaiB [85,86,99,103]. Nishiwaki und Kollegen zeigten jedoch, dass die KaiC-KaiB-Komplexe im Laufe eines *in vitro* Phosphorylierungszyklus erst auftreten, wenn KaiC^{pS/T} dominiert und postulierten daher, dass KaiB erst nach der spontanen Dephosphorylierung von T432 stabil gebunden wird [85]. Damit übereinstimmend wurde demonstriert, dass der Phosphorylierungszustand von S431 für die KaiB-Bindung entscheidend, der von T432 hingegen irrelevant ist [85,86,99]. Die von uns etablierte Erzeugung stabiler KaiC-KaiB-Komplexe durch lange Inkubation bei 4 °C ging demnach vermutlich primär auf die Anreicherung von phosphoryliertem S431 im resultierenden KaiC^{pS/pT} zurück.

Methodisch weist die Generierung phosphorylierten KaiC durch Inkubation bei niedriger Temperatur im Vergleich zu den zuvor zitierten Analysen den Vorteil auf, dass die Interaktion von KaiB und KaiC unter Verwendung von unmodifizierten Wildtyp-Proteinen untersucht werden kann. Der Austausch einzelner Aminosäuren dient zwar als elegante Möglichkeit bestimmte Zustände eines Proteins zu imitieren, darf aber nicht als völlig identisch mit diesem Zustand angesehen werden. Bezüglich der Phosphorylierung ist vor allem zu bedenken, dass die Imitation eines Phosphatrests durch Glutamat oder Aspartat eine drastische Änderung des elektrischen Oberflächenpotenzials des CII-Rings nach sich zieht [99,201]. Zudem kann die Aminosäuresubstitution lokale Konformationsänderungen und die Phosphorylierung anderer Aminosäuren hervorrufen [99]. Des Weiteren wurde bereits beobachtet, dass Funktion und Phosphorylierungsmuster der KaiC-Mutanten von jener der imitierten Phosphorylierungsform abweichen können [28,88,201]. Dagegen blieben die Aktivitäten bei der hier gewählten Inkubation bei 4 °C konserviert: Die stetige Phosphorylierung belegte die Kinase-Aktivität (Abbildung 2-1 und Abbildung 2-2). Zudem war das Protein nach der Inkubation noch zur Dephosphorylierung bei 30 °C fähig, was einen Verlust der ATPase- und ATP-Synthase-Aktivitäten in der CII-Domäne ausschließt (Abbildung 2-3). Da die ATPase-Aktivität in CI für die KaiB-Bindung essenziell ist [105,116], kann zudem angenommen werden, dass auch diesbezüglich kein Aktivitätsverlust stattfand. Stattdessen wurde ein funktionales KaiC-Protein generiert, das nahezu den maximal möglichen *in vivo* Phosphorylierungsgrad (90 %, [58]) aufwies.

3.1.2 Sechs KaiB-Monomere binden über ihre helikale Fläche an den CII-Ring von KaiC

Die in Zusammenarbeit etablierte Methode, durch verlängerte Inkubation bei 4 °C besonders stabile KaiC-KaiB-Komplexe zu generieren, wurde sich zu Nutze gemacht, um durch einen Wasserstoff-Deuterium-Austausch mit anschließender MS (HDX-MS) herauszufinden, welche strukturellen Veränderungen bei der Interaktion von KaiB mit KaiC erfolgen und wo die jeweiligen Bindestellen lokalisiert sind (Joost Snijder, [203]). Das KaiC-Hexamere wies nach Interaktion mit KaiB sowohl im CI- als auch im CII-Ring mehrere Bereiche auf, die weniger exponiert vorlagen, als im isolierten Protein. Insgesamt implizieren die Messungen, dass KaiB mit seiner α -helikalen Seite entweder an die Reste 92-99 sowie 126-132 der CI-Domänen oder - direkt oberhalb der ATP-Bindestellen - an die Grenzflächen der assemblierten CII-Hälften des KaiC-Hexamers bindet. Dabei scheint eine Konformationsänderung im KaiB-Monomer stattzufinden, durch die der N-Terminus exponiert vorliegt. Zudem legen die Daten nahe, dass die Interaktion von allosterischen Veränderungen im KaiC-Hexamere begleitet wird, die den Kontakt der Monomere leicht verstärken und zu einer etwas dichteren Packung der hexameren Ringe führen. Durch die HDX-MS-Daten wurde zudem die allosterische Verknüpfung der CI- und CII-Domäne [72,83,98,105,107] eindeutig belegt, da in beiden Domänen nach KaiB-Bindung geschützte Bereiche detektiert wurden. Die starke Kopplung erklärt, warum in den letzten Jahren sehr widersprüchliche Befunde zum Ort der KaiB-Bindung publiziert wurden. Dass die KaiB-Bindung durch Assoziation an die eine Hälfte Konformationsänderungen und ggf. eine Modulation der Aktivitäten in der anderen Hälfte hervorruft, kann die Interpretation von Bindungsstudien und Aktivitätstests erschweren.

Bindet KaiB nun an den CII-Ring und beeinflusst dadurch die Konformation der CI-Hälfte oder erfolgen die strukturellen Veränderungen in den CII-Domänen stattdessen durch die Assoziation von KaiB an den CI-Ring? Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde eine Ionen-Mobilitäts-MS (IM-MS) durchgeführt und mit einer strukturellen Modellierung abgeglichen (Joost Snijder, [203]). Dabei wurden die durch die MS-Analysen nach Deuterium-Austausch gewonnen Informationen sowie die Röntgenkristallstrukturen des KaiB- und KaiC-Proteins (PDB ID 4KSO, [200] bzw. PDB ID 3DVL, [227]) berücksichtigt. Es wurde ein Modell vorgeschlagen, nach dem sechs KaiB-Monomere an den Grenzflächen der zum Hexamer assemblierten CII-Domänen binden und dadurch - versetzt auf dem CII-Ring sitzend - einen durchgehenden Ring ausbilden (Abbildung 3-1, [203]).

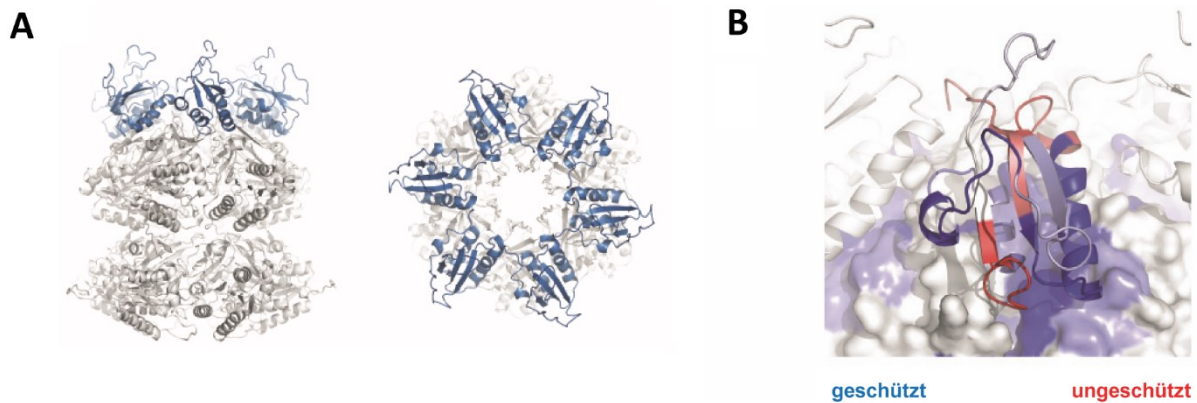


Abbildung 3-1. Rekonstruktion des KaiC-KaiB-Komplexes A. Sechs KaiB-Monomere binden an der Oberseite des CII-Rings. Auf Basis eines *molekularen dockings* unter Berücksichtigung des durch IM-MS bestimmten Kollisionsquerschnitts sowie der durch HDX-MS gewonnenen Informationen wurde ein Modell des C6B6-Komplexes erstellt. Gezeigt sind die Seitenansicht (links) und Draufsicht (rechts). KaiB-Monomere sind blau, das KaiC-Hexamer ist grau dargestellt. **B. Die KaiB-Monomere binden jeweils zwischen zwei benachbarten CII-Domänen.** Veränderungen in der Deuteriumaufnahme, die mit der Interaktion von KaiB und KaiC einhergehen, wurden auf die Struktur des rekonstruierten Komplexes projiziert. Ungeschützte Bereiche sind rot, geschützte Bereiche blau markiert. Die Analysen wurden von Joost Snijder durchgeführt und ausgewertet. Auch die Abbildung wurde von Joost Snijder für die Publikation in *Proc Natl Acad Sci USA* [203] erstellt und ist hier in einer deutschen Übersetzung gezeigt.

Die Bindung des KaiB-Proteins an die CII-Domäne von KaiC wird durch die ersten biochemische Analysen zur KaiC-KaiB-Interaktion gestützt: Nach Inkubation von KaiB mit den isolierten KaiC-Domänen konnte durch native PAGE eine Bindung an die CII-Domäne, nicht aber an die CI-Domäne demonstriert werden [218]. Damit übereinstimmend positionierte eine *in silico* Rekonstruktion unter Berücksichtigung der Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS, für engl. *small angle X-ray scattering*) KaiB an den CII-Ring [98]. Durch EM-Aufnahmen eines KaiC-KaiB-Komplexes, in dem KaiC Ni-NTA-Nanogold über einen C-terminalen His-tag gebunden hatte, konnten Pattanayek und Kollegen aufgrund der hohen Elektronendichte der Goldpartikel die ansonsten schwer zu unterscheidenden CI- und CII-Ringe eindeutig identifizieren [228]. Dadurch wurde die bereits nach früheren EM-Analysen postulierte Bindung an den CII-Ring zweifelsfrei validiert [99,228]. Das hier auf Basis der HDX-MS-Analysen erstellte Modell der KaiC-KaiB-Bindung deckt sich darüber hinaus hervorragend mit einer kürzlich veröffentlichten Rekonstruktion, bei der Kryo-EM-Aufnahmen eines Komplexes aus KaiB und einer konstitutiv phosphorylierten KaiC-Variante als Grundlage für ein *molekulares docking* dienten [200]. Dabei erfolgt die Bindung ebenfalls über die α -Helices von KaiB [200]. Acht der zehn laut Villarreal und Kollegen am stärksten mit KaiB interagierenden Reste von KaiC bilden auch in unserem Modell intermolekulare Interaktionen aus (Abbildung 2-4, [200,203]). Seitens KaiB wurden sieben der zehn Reste, welche in der

Kryo-EM-Struktur die stärksten Interaktionen ausbilden, ebenfalls als interagierende Reste definiert (Abbildung 2-5, [200,203]).

In beiden Modellen assoziiert KaiB über der ATP-Bindestelle des CII-Rings, so dass diese distal verdeckt wird [200,203]. Da die CI- und CII-Ringe leicht verdreht aufeinander sitzen, werden die Nukleotid-Bindestellen auf der proximalen Seite des CII-Rings zudem dauerhaft von den CI-Domänen bedeckt [72]. Dies impliziert, dass die Bindung von KaiB die Austauschrate von gebundenem ADP gegen ATP an den *P-Loops* der CII-Domänen direkt durch eine räumliche Blockade verhindern könnte. Zudem verstärkt die KaiB-Bindung den Kontakt der beiden KaiC-Ringe [203], welcher die Nukleotidaustauschrate bereits in KaiC^{pS/pT} reduzieren soll [91]. Eine Rolle von KaiB in der Regulation der Nukleotidverfügbarkeit wird auch dadurch suggeriert, dass die Inkorporation von ATP im Laufe eines circadianen Zyklus dann am niedrigsten ist, wenn KaiC^{pS/T} und damit die größte Zahl an KaiC-KaiB-Komplexen vorliegt [85,91]. Sicher ist, dass KaiB die Phosphorylierung von KaiC inhibiert, indem es der stimulierenden Wirkung von KaiA durch dessen Sequestrierung entgegenwirkt [99,101,108-111]. Vermutlich wird durch die Bindung von KaiB an KaiC^{pS/T} eine neue Bindestelle geschaffen, an die KaiA mit höherer Affinität bindet [85,86,99,101,108]. In diesem Zusammenhang sind die allosterischen Veränderungen im KaiB-Molekül nach Bindung an KaiC interessant. Im hier postulierten Modell des KaiC-KaiB-Komplexes (Abbildung 3-1) könnten die sechs KaiB-Monomere KaiA jeweils über ihr exponiert liegendes β -Faltblatt und ggf. angrenzende Reste binden. Dies wird indirekt durch Kernspinresonanz-Studien unterstützt, die eine Interaktion zwischen einer N-terminal verkürzten KaiA-Variante und einer C-terminal verkürzten KaiB-Mutante nachwiesen [96] wodurch der C-Terminus des KaiB-Proteins als KaiA-Bindestelle ausgeschlossen werden kann.

Neben den diskutierten Daten, die unser Modell der KaiB-Bindung an den CII-Ring stützen, wurde in den letzten zwei Jahren auch eine Bindung an die CI-Domänen von KaiC vorgeschlagen [96,104,105,116]. Die Gruppe um Masahiro Ishiura wies durch Inkubation in Abwesenheit von ATP die Bindung einer verkürzten KaiB-Variante an monomere CI-Domänen nach, konnte aber keine Interaktion mit monomeren CII-Domänen beobachten, die den doppelt phosphorylierten Zustand imitierenden [116]. Der darauf basierenden Schlussfolgerung, KaiB assoziiere ausschließlich an die CI-Hälften des KaiC [116], ist entgegenzusetzen, dass KaiB sowohl nach unserem als auch nach dem Kryo-EM-basierten Modell [200] immer mit zwei CII-Hälften gleichzeitig interagiert. Dadurch kann die KaiB-Bindung erst nach Assemblierung

der CII-Monomere zu Oligomeren erfolgen. Davon unabhängig wurde die Interaktion von Wildtyp-KaiB sowie verkürzten KaiB-Varianten mit monomeren CI-Hälften mehrfach bestätigt [96,104,116]: Eine Assoziation mit ursprünglich hexameren CI-Domänen erfolgte allerdings nur nach deren Disassemblierung bzw. Destabilisierung [104,116]. Zudem konnten stabile Komplexe nur bei Verwendung von C-terminal verkürzten KaiB-Varianten generiert werden [104,116], die gravierende strukturelle und elektrostatische Veränderungen aufweisen [96,104,116,199,201].

Interessanterweise schlugen Tseng und Kollegen einen flexiblen Bereich (*B-Loop*, Reste 116-123) als Bindestelle in der CI-Domäne vor, in dessen Nähe durchaus eine verminderte Deuteriumaufnahme nach KaiB-Bindung gemessen wurde [203]. Auch bei den Kryo-EM-basierten *in silico* Modellen von Villarreal und Mitarbeitern, die eine KaiB-Bindung an die CI-Domäne simulierten, wurden die Reste 112-121 als potenzielle Bindestelle definiert. Ähnlich zu unseren Studien wurden aber alle theoretischen Modelle einer KaiB-Bindung an CI aufgrund von Unzulänglichkeiten aussortiert [200,203]. Phong und Kollegen postulierten, dass KaiB immer nur nach ATP-Hydrolyse an einen transienten, aktivierten Zustand des CI-Rings binden kann, in welchem die CI-Monomere gelockert sind [105]. Daher kann ein erhöhter ATP-Anteil die KaiC-KaiB-Interaktion inhibieren [104,116]. Bei 4 °C erfolgt eine verstärkte ATP-Bindung an KaiC [90]. Demnach lagen die CI-Ringe bei unserem Ansatz stabile KaiC-KaiB-Komplexe durch Inkubation bei 4 °C zu erzeugen, für eine Exposition potenzieller KaiB-Bindestellen zu fest assoziiert vor.

Aufgrund der Überschneidungen der potenziellen CI-Bindestellen wäre denkbar, dass KaiB an beide Domänen bindet und damit unterschiedliche Funktionen ausübt. Die in unserem Modell dargestellte Assoziation von sechs KaiB-Monomeren an den CII-Ring führt vermutlich zur Ausbildung ternärer KaiC-KaiB-KaiA-Komplexe und somit zur robusten KaiA-Sequestrierung. Die transiente Assoziation an die CI-Domänen könnte hingegen den KaiC-Monomeraustausch fördern [79,200], auch wenn zunächst berichtet wurde, KaiB habe keinen Einfluss darauf [84,113].

3.1.3 Ausblick: weiterführende Analysen zum KaiC-KaiB-(KaiA)-Komplex

Die hier diskutierten Bindungsstudien konnten wichtige molekulare Details des KaiC-KaiB-Komplexes im Zusammenhang mit dessen Phosphorylierung aufdecken. Um die Interaktionsflächen zweifelsfrei (experimentell) zu bestimmen, sollten weiterführende MS-

Analysen nach kovalenter Fixierung der Interaktionen durch ein *Cross-Linking*-Reagenz durchgeführt werden. Wünschenswert wäre zudem eine Ko-Kristallisation von KaiC und KaiB. Hierzu könnte die Erzeugung stabiler Komplexe durch Inkubation bei 4° C unter Verwendung von KaiC und KaiB aus dem thermotoleranten Stamm *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 dienlich sein. Zudem sollte der Einfluss von Modifikationen in den hier vorgeschlagenen Bindemotiven auf die KaiC-KaiB-Interaktion sowie KaiC-Phosphorylierung durch native PAGE, SDS-PAGE und native MS untersucht werden. In Abschnitt 2.1 wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von KaiC auch in Anwesenheit von KaiB und KaiA bei 4 °C stetig zunahm und sich zunehmend höhermolekulare Komplexe ausbildeten. Nach verlängerter Inkubation aller drei Kai-Proteine bei 4 °C war KaiC stark phosphoryliert und dessen Laufverhalten im Vergleich zu den KaiC-KaiB- und KaiC-KaiA-Komplexen verändert (nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass ternäre Komplexe bei 4 °C gebildet wurden. Aufgrund der Instabilität sollten diese bei zukünftigen Gelanalysen in Anwesenheit nicht hydrolysierbarer ATP-Analoga aufgetrennt oder durch native MS untersucht werden, um weitere Informationen zur Synchronisierung der Dephosphorylierung durch KaiA-Sequestrierung zu gewinnen. Zudem könnten MS-basierte Methoden auch zur weiterführenden Charakterisierung des Monomeraustauschs eingesetzt werden. Dazu müssten Monomere unterschiedlicher Massen z. B. durch Aminosäureaustausche oder den Einbau von Isotopen generiert werden [225].

3.2 Multiple Kai-Proteine in *Synechocystis*

Synechocystis unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von *Synechococcus*. Hervorzuheben sind eine abweichende Zellmorphologie und Zellteilung, die Fähigkeit Glucose als Kohlenstoffquelle zu verwerten sowie die Expression multipler Kai-Proteine. Um einzugrenzen warum *Synechocystis* zudem einen abweichenden zeitlichen *Output* zeigt, wurden die multiplen Kai-Proteine biochemisch charakterisiert. Im Folgenden werden zunächst die *in vitro* Studien im Zusammenhang mit den *in silico* Vorhersagen diskutiert (3.2.1). Aus der sich anschließenden Betrachtung der *in vivo* Daten (3.2.2 und 3.2.3) lässt sich ableiten, dass *Synechocystis* möglicherweise die Fähigkeit zu einer konditionellen circadianen Rhythmik besitzt.

3.2.1 Biochemische Eigenschaften der multiplen Kai-Proteine aus *Synechocystis*

In vitro Analysen bieten die Möglichkeit, Enzymaktivitäten und Proteinwechselwirkungen unabhängig von weiteren - möglicherweise komplexen - Regulationsebenen in der Zelle zu

betrachten und somit Grundlagen für das Verständnis molekularer Mechanismen zu liefern. Im Zusammenhang mit der circadianen Uhr wurde dies u. a. durch die maßgeblichen Experimente von Nakajima und Kollegen demonstriert, die durch die *in vitro* Rekonstruktion der KaiC-Phosphorylierung dessen prinzipielle Unabhängigkeit von einem TTFL nachwiesen [63].

Daher wurden die multiplen Kai-Homologe aus *Synechocystis* in dieser Arbeit zunächst ebenfalls heterolog exprimiert, um anschließend grundlegende biochemische Eigenschaften und darauf basierende Vorhersagen zu ihrer Funktion herauszuarbeiten. Da die Kai-Homologe divergierte Untergruppen repräsentieren [183,197], dienen diese Untersuchungen zudem als exemplarische Betrachtung für phylogenetisch verwandte Proteine: Während KaiC1 das Ortholog des *Synechococcus*-KaiC darstellt, finden sich in *Microcystis* und *Cyanothece* Proteine mit Ähnlichkeit zu KaiC3, in *Chloroflexi*, Proteobakterien und Archaeen solche mit Ähnlichkeit zu KaiC2 [183,196]. Auch KaiB1 weist starke Ähnlichkeit zu dem gut untersuchten *Synechococcus* Protein auf [197], wohingegen KaiB3 phylogenetisch z.B. mit dem zusätzlichen KaiB-Homolog aus *Crocospaera* verwandt ist [197]. KaiB2 hat die größte Ähnlichkeit zu KaiB-Proteinen aus *Rhodospseudomonas* und *Chloroflexus* [197] sowie zu KaiB aus *Legionella pneumophila str. Paris* (KaiB_{lpp}), das kürzlich biochemisch charakterisiert wurde [204].

3.2.1.1 Expression und Reinigung der Kai-Proteine aus *Synechocystis*

Die heterologe Expression und Präparation von KaiA₆₈₀₃, KaiB1, KaiB3 und KaiC3 gelang mit sehr guten Ausbeuten und in hoch reiner Form (2.2.2.1). Zudem wurden die Protein-Varianten KaiC3-AA und KaiC3-DE generiert, welche sich ebenfalls erfolgreich exprimieren und reinigen ließen (2.2.2.4). Das rekombinante KaiA₆₈₀₃ konnte nicht nur für *in vitro* Studien, sondern auch zur Produktion eines Antikörpers genutzt werden, welcher die Charakterisierung der Abundanz und Verteilung des KaiA₆₈₀₃ in der Zelle ermöglichte (2.2.3). Die Expression von KaiC1 in *E. coli* lieferte zwar nur wenig, äußerst instabiles KaiC1, erlaubte aber dennoch erste Analysen.

3.2.1.2 KaiC1, KaiC2 und KaiC3 zeigen eine *in vitro* Phosphorylierung

In Übereinstimmung mit den *in silico* Vorhersagen (2.2.1) wurde für KaiC1 und KaiC3 *in vitro* eine Autophosphorylierung demonstriert (2.2.2.3 und 2.2.2.4). Durch vergleichbare Analysen wies Anja K. Dörrich auch für FLAG-KaiC2, das nach homologer Expression aus

Synechocystis isoliert wurde, eine Autokinase-Aktivität nach (gemeinsam veröffentlicht in *Microbiology*, [183]). Zudem wurde die Relevanz der Phosphorylierung aller drei KaiC-Proteine in der Zelle durch eine Phosphoproteom-Studie bestätigt [229].

Bei den *in vitro* Untersuchungen wurde lediglich die Autophosphorylierung von KaiC1 durch KaiA beeinflusst (2.2.2.3). KaiC3 und KaiC2 dagegen zeigten eine von KaiA unabhängige Kinase-Aktivität (2.2.2.4 und Wiegard *et al.* [183]). Durch Ko-Immunopräzipitation bestätigte Dr. Julia Holtzendorff zudem, dass KaiA₆₈₀₃ *in vivo* an KaiC1 bindet, während keine Interaktion mit KaiC2 und KaiC3 gefunden wurde [183]. Ergänzend wurde in der vorliegenden Arbeit demonstriert, dass KaiA₆₈₀₃ sein Homolog aus *Synechococcus* trotz geringer Sequenzidentität (41 %) bezüglich der Stimulation der Kinase-Aktivität von KaiC₇₉₄₂ ersetzen kann (2.2.2.2). Daher ist davon auszugehen, dass die Wechselwirkungen zwischen KaiC1 und KaiA₆₈₀₃ vergleichbar zu den *Synechococcus* Orthologen ablaufen, wohingegen KaiC2 und KaiC3 die mangelnde Interaktion mit KaiA₆₈₀₃ vermutlich durch eine Exposition der *A-Loops* kompensieren. Solch eine stetige Exposition erklärt, warum die Phosphorylierung des KaiC3 weder durch KaiA noch durch Inkubation bei niedrigen Temperaturen weiter gesteigert werden konnte (2.2.2.4). Eine vergleichbare Unabhängigkeit von KaiA wurde bereits für KaiC aus *Prochlorococcus*, dessen *kaiA*-Gen im Zuge der Genomreduktion deletiert wurde, beschrieben [179]. Auch für weitere Cyanobakterien kann eine KaiA-unabhängige KaiC-Phosphorylierung vorhergesagt werden [142].

3.2.1.3 Die *in vitro* Aktivitäten des KaiC3 sind im Vergleich zu KaiC₇₉₄₂ modifiziert

Neben der Phosphorylierung wurde für KaiC3 in dieser Arbeit eine ATPase- und ATP-Synthase-Aktivität nachgewiesen (2.2.2.5 und 2.2.2.6). Dass die Vorhersagen auf Basis der Sequenzalignierung hier erneut bestätigt wurden, stützt die Hypothese, dass auch KaiC1 und KaiC2 diese Aktivitäten aufweisen (2.2.1). Auffällig war, dass KaiC3 zwar alle typischen Enzymaktivitäten zeigte, die Ausprägung jedoch modifiziert war. Es inkorporierte nur etwa ein Drittel der γ -³²P-Menge, die in Anwesenheit von KaiA₇₉₄₂ an KaiC₇₉₄₂ gebunden wurde (Abbildung 2-9.B). Da die Phosphataufnahme bereits nach zwei Stunden nicht mehr linear erfolgte, ist davon auszugehen, dass der geringere Phosphateinbau nicht aus einer langsameren Kinase-Aktivität resultierte, sondern pro KaiC3-Hexamer weniger Phosphat gebunden wurde. Möglich wäre, dass nur ein Teil der zum Hexamer assemblierten KaiC3-Monomere

phosphoryliert vorliegt oder aber pro KaiC3-Monomer vorwiegend nur eine Aminosäure phosphoryliert wird.

Da die Phosphorylierungsformen des KaiC3 gelelektrophoretisch nicht so distinkt separierbar waren wie jene des KaiC₇₉₄₂ (Vergleiche Abbildung 2-2 und 2-10), kann die Zahl der Phosphorylierungsstufen nicht eindeutig benannt werden. KaiC3-AA zeigte das gleiche Laufverhalten wie dephosphoryliertes KaiC3 (Abbildung 2-10). Zudem wurde in der bereits zitierten Phosphoproteom-Studie ausschließlich an S423 und/oder T424 eine Phosphorylierung nachgewiesen [229]. Demnach ist anzunehmen, dass neben den in dieser Arbeit substituierten Aminosäuren, keine weiteren Serin-, Threonin- (oder Tyrosin-) Reste stabil phosphoryliert werden. Während Varianten, die KaiC₇₉₄₂^{pS/pT} imitieren, exakt auf Höhe des doppelt phosphorylierten Proteins laufen [85], zeigte KaiC3-DE allerdings eine etwas höhere Mobilität als die höchste Phosphorylierungsstufe von KaiC3 (Abbildung 2-10). Dies kann als Indiz gewertet werden, dass die doppelt phosphorylierte Form von KaiC3 unter den getesteten Bedingungen nicht eingenommen wurde oder eine im Vergleich zu KaiC3-DE veränderte Konformation besitzt. Nach Substitution von Alanin422 gegen Valin wies KaiC₇₉₄₂ nach Röntgenstrukturdaten ausschließlich Phosphorylierungen an T432 auf [61,79]. Daher sollte massenspektrometrisch (siehe z.B. Axmann *et al.* [179]) überprüft werden, ob die Modifikationen des 422-Loops und insbesondere die Substitution von Alanin gegen Glycin in KaiC3 (Abbildung 2-4) ebenfalls zur vorwiegenden Phosphorylierung von T424 führen. Vergleichende Untersuchungen zur Phosphorylierung, Dephosphorylierung und Mobilität von KaiC3-Varianten, welche KaiC3^{S/pT} und KaiC3^{pS/pT} imitieren bzw. den 422-Loop des KaiC₇₉₄₂ wiederhergestellt haben, könnten zudem Aufschlüsse zum Phosphorylierungszustand liefern.

Die Hypothese einer geringeren Phosphorylierung wurde auch durch die im Vergleich zu KaiC₇₉₄₂ um zwei Drittel reduzierte ATP-Synthese bestätigt. Da sich das Verhältnis der beiden dominantesten Phosphorylierungsformen von KaiC3 unter keiner der getesteten Bedingungen änderte (2.2.2.4), ist eine gleichmäßige Phosphorylierung und Dephosphorylierung denkbar. Möglich wäre aber auch, dass das Maximum der ATP-Synthese nach zwei Stunden schon überschritten und gebildetes ATP bereits hydrolysiert war. In weiterführenden Experimenten sollte darum eine zeitaufgelöste Untersuchung vorgenommen werden.

Hinweise auf einen potenziell schneller laufenden Zyklus ergaben sich aus der Untersuchung der ATPase-Aktivität. Der ermittelte ATP-Umsatz unterschied sich nicht signifikant von KaiC₇₉₄₂, war aber tendenziell erhöht. Da die Frequenz der circadianen Oszillationen in

KaiC₇₉₄₂ mit steigender ATPase-Aktivität zunimmt, könnte die potenziell gesteigerte ATPase-Aktivität eine Rolle bei dessen Einfluss auf die Periodenlänge spielen [196]. Es gilt zu untersuchen, ob die möglicherweise erhöhte ATPase-Aktivität von KaiC3 in einer gesteigerten Grundaktivität in der CI-Domäne begründet lag oder aber aufgrund der verringerten ATP-Synthase-Aktivität weniger ATP regeneriert wurde, was letztendlich zu einer reduzierten Netto-ATP-Hydrolyse führte (siehe auch Johnson und Egli [12]). Untersuchungen mit Varianten, in denen die ATPase-Aktivität der einzelnen Domänen durch einen Austausch der katalytischen Carboxylate abgeschaltet wird, sowie eine Analyse der isolierten Domänen sollten hier weitere Aufschlüsse liefern. Die in dieser Arbeit angewandte Methodik eignete sich zur schnellen Demonstration der ATPase-Aktivität von KaiC3. Für KaiC₇₉₄₂ wurde jedoch eine gegenüber den Messungen von Terauchi und Kollegen leicht erhöhte ATPase-Aktivität ermittelt [81]. Zudem lagen starke Abweichungen bei den Einzelpunktmessungen nach 24 Stunden vor. Dies war vermutlich durch die Verwendung unterschiedlich phosphorylierter Proteine bedingt, da der Phosphorylierungsgrad die ATPase-Aktivität beeinflusst [80,81]. Zeitaufgelöste Messungen, über 24 Stunden, wie sie zur Bestimmung der Aktivität von KaiC_{MED4} durchgeführt wurden [179], sollten zu geringeren Abweichungen und exakteren Werten führen. Der störende Einfluss „kontaminierenden“ Phosphats (z. B. in Reaktionsgefäßen) kann alternativ durch eine optische Bestimmung des gebildeten ADP bei 260 nm nach chromatografischer Trennung umgangen werden [81,83]. Messungen in Anwesenheit der KaiB-Proteine könnten zudem Aufschlüsse darüber liefern, ob die ATPase-Aktivität von KaiC3 zyklisch erfolgt oder analog zu KaiC_{MED4} nur als eine Art Sanduhr funktionieren kann [179]. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die CI- und CII-Ringe des KaiC3 ggf. weniger stark miteinander gekoppelt sind als in KaiC1 (2.2.1), was die Verknüpfung von KaiB-Bindung (CII) und ATPase (CI) modulieren könnte.

3.2.1.4 KaiB1 und KaiB3 interagieren mit KaiC₇₉₄₂

Mithilfe der erfolgreich etablierten Methode zur Generierung stabiler KaiC₇₉₄₂-KaiB₇₉₄₂-Komplexe wurde auch die Interaktion von KaiC₇₉₄₂ mit den KaiB-Homologen untersucht. Darauf basierend können in Anbetracht der starken Identität mit KaiC1 Annahmen zu dessen Wechselwirkung mit den KaiB-Proteinen getroffen werden. Vermutlich aufgrund der starken Konservierung der relevanten Aminosäuren (Abbildung 2-5) wurde eine Assemblierung von KaiB1 und KaiC₇₉₄₂ beobachtet (Abbildung 2-7). Daher konnte KaiB1 der Phosphorylierung von KaiC₇₉₄₂ in Anwesenheit von KaiA₆₈₀₃ entgegenwirken (2.2.2.2) und eine *kaiB*₇₉₄₂-Deletion

in *Synechococcus* komplementieren [230]. Auch KaiB3 und KaiB_{MED4} interagierten mit KaiC₇₉₄₂. Da KaiB_{MED4} die Dephosphorylierung des KaiC₇₉₄₂ beeinflussen kann [179], wäre eine Modulation der KaiC1-Aktivität (als Ortholog des KaiC₇₉₄₂) durch KaiB3 ebenfalls denkbar. Zudem gilt zu klären, inwiefern die KaiB-Varianten die (putative) ATPase-Aktivität von KaiC1 beeinflussen können.

Dass KaiB3 und KaiB_{MED4}, nicht aber KaiB2 mit KaiC₇₉₄₂ assoziierten, demonstrierte erneut die Bedeutung der negativen Ladung am C-Terminus des KaiB. KaiB2 dagegen weist dort lediglich einen Aspartatrest auf (Abbildung 2-5). Da die an der Interaktion beteiligten Aminosäuren in der C-terminalen Hälfte des mit KaiC₇₉₄₂ interagierenden KaiB3 stärker konserviert sind als in der N-terminalen Hälfte, ist ferner davon auszugehen, dass diesen Resten eine größere Bedeutung bei der Bildung des KaiC-KaiB-Komplexes zukommt (Abbildung 2-5 und 2-7). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass die Struktur des KaiB2-Homologs aus *Legionella pneumophila* str. Paris deutlich von jenen der bislang röntgenkristallografisch analysierten „Standard“-KaiB-Proteinen abweicht [204]. Die strukturellen Unterschiede zu KaiB1 sind in der C-terminalen Hälfte deutlich ausgeprägter [204]. Dagegen ist die Faltung von KaiB1 und KaiB₇₉₄₂ sehr ähnlich [200,205]. Eine Kristallisation von KaiB3 und ein detaillierter Vergleich mit den Strukturen von KaiB1 [205] und KaiB_{lpp} [204] könnte wichtige Aufschlüsse über strukturelle und funktionelle Unterschiede der drei Untergruppen von KaiB-Proteinen liefern.

3.2.1.5 Schlussbetrachtung zur *in vitro* Aktivität der multiplen Kai-Proteine

Insgesamt lassen die *in silico* und *in vitro* Analysen vermuten, dass KaiA₆₈₀₃, KaiB1 und KaiC1 einen Oszillator bilden, der ortholog zu den *Synechococcus*-Proteinen funktioniert. KaiB3 könnte die KaiC1-Phosphorylierung zusätzlich beeinflussen. Auch KaiC3 übernimmt ggf. eine modulierende Funktion [196]. Fraglich ist, ob es dafür Phosphorylierungsrhythmen durchläuft, zumal die Phosphorylierung auch von den KaiB-Proteinen nicht beeinflusst wurde (2.2.2.4). Begründet liegt dies vermutlich darin, dass KaiB nur als Antagonist von KaiA [60,92] oder ggf. unbekannten Faktoren wirken kann. Dong und Kollegen fanden Hinweise auf eine KaiA₇₉₄₂-unabhängige *in vivo* Phosphorylierung von KaiC₇₉₄₂, die durch CikA indirekt unterdrückt wird [28]. Ggf. sind Komponenten dieses bislang ungeklärten Mechanismus auch in *Synechocystis* vorhanden und können der intrinsischen KaiC3-Phosphorylierung entgegenwirken, um so potenzielle Phosphorylierungsrhythmen zu erzeugen. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte

zukünftig die KaiC3-Phosphorylierung nach Inaktivierung von *hik24* (*cikA*-Homolog in *Synechocystis*) analysiert werden.

Wie könnten die modifizierten Enzymaktivitäten des KaiC3 potenzielle Oszillationen von KaiC1 beeinflussen? Eine direkte Interaktion von KaiC1 und KaiC3 wurde anhand von Ko-Immunopräzipitations-Daten ausgeschlossen [183]. Stattdessen wurde die Präsenz von KaiC1-, KaiC2- und KaiC3-Homooligomeren nachgewiesen [183]. Möglich wäre, dass eine Kommunikation zwischen den KaiC-Oligomeren durch die KaiB-Proteine vermittelt wird. In Anbetracht der nachgewiesenen Interaktion mit KaiC₇₉₄₂ (Abbildung 2-7) scheint eine Wechselwirkung von KaiB3 mit KaiC1 wahrscheinlich, sollte aber – wie auch die Interaktion mit KaiC3 – überprüft werden. Zudem gilt es zu untersuchen ob dieser potenzielle KaiC1-KaiB3-Komplex durch KaiA-Sequestrierung Einfluss auf die KaiC1-Phosphorylierung nehmen kann. KaiC1 kann hierfür durch homologe Expression in *Synechocystis* als FLAG-Fusionsprotein in funktioneller Form gewonnen werden [183]. Aufgrund der vergleichsweise langen Generationszeit von *Synechocystis* sollte jedoch zudem ein alternatives System zur heterologen Expression getestet werden. Bislang wurde KaiC1 bei Expression in *E. coli* unabhängig von der Expressionstemperatur in *inclusion bodies* eingelagert, ein Prozess der allgemein durch eine Reduktion der Expression verhindert werden kann [231]. Darum bieten sich z. B. eine Modifizierung der kodierenden Sequenz unter Berücksichtigung der *codon usage* von *E. coli* oder aber eine Veränderung der Ribosomen-Bindestelle an [232]. Eine höhere Stabilität könnte ggf. durch eine regulierte periplasmatische Expression erzielt werden, die die Ausbildung potenzieller Disulfidbrücken erlaubt [233]. Darüber hinaus wäre eine Expression in anderen prokaryotischen Wirten, wie z. B. *Staphylococcus carnosus* oder *Lactococcus Lactis* denkbar [234,235].

Für KaiC2 und KaiB2 wurde bereits postuliert, dass sie keine Rolle in der zeitliche Koordination spielen [196]. Bisherige Interaktionsstudien lieferten auch keine Hinweise auf eine Wechselwirkung mit KaiC1 [183] bzw. KaiC₇₉₄₂ (Abbildung 2-7). Obschon die kodierenden Gene im Genom des nahen Verwandten *Synechocystis* sp. PCC 6741 nicht konserviert sind [190], ist das *kaiC2B2-Cluster* im Gegensatz zu den anderen *kai*-Genen für *Synechocystis* essenziell [207]. Da die Expression von *kaiB2* bei oxidativem Stress und jene von *kaiC2* bei Eisenstress hoch reguliert wird [236], erscheint eine Funktion in der Stressresistenz, wie sie für die Homologe aus *Legionella pneumophila* str. Paris nachgewiesen wurde [204], wahrscheinlich.

3.2.2 Zeitliche Koordination in *Synechocystis* bei langsamem Wachstum

Nachdem einige grundlegende Aktivitäten der Kai-Proteine demonstriert waren, wurde deren temporäres und räumliches Verhalten in der Zelle im Zusammenhang mit einer zeitlichen Koordination untersucht. Dabei wurde neben der Untersuchung potenzieller circadianer Rhythmen berücksichtigt, dass die meisten Vertreter in ihren natürlichen Habitaten Licht-Dunkel-Rhythmen ausgesetzt sind [237]. Vor dem gleichen Hintergrund wurde die cyanobakterielle Aktivität bereits in einer Vielzahl von Studien unter dem Einfluss externer LD-Rhythmen oder einer Kombination von LD mit LL und DD betrachtet [20,21,40,144,170,171,173,174,195,238-252]. So konnte z.B. für die Gattungen *Synechococcus* [21,26,27,29-31,34,35,143,241], *Cyanothece* [20,24,34,35,41,170-172,239,240], *Prochlorococcus* [40,173,244-252] und *Microcystis* [243] eine zeitliche Struktur beschrieben werden. Zudem wurden – wie in Abschnitt 1.5 dargestellt- zyklische Aktivitäten von *Synechocystis* beobachtet [35,191-195,253]. Problematisch beim Vergleich der Studien ist allerdings, dass sich die experimentellen Herangehensweisen - angefangen bei den Lichtbedingungen (LD, LL, DD) - stark unterscheiden. Oftmals gestaltet sich eine Gegenüberstellung diurnaler und circadianer Phänomene dadurch schwierig. Aus diesem Grund wurde hier ein besonderes Augenmerk darauf gelegt, diurnale und Freilaufbedingungen parallel einzubeziehen. Zur Vergleichbarkeit wurde in jedem der drei in Abschnitt 2.2.3.1 beschriebenen Zeitserienexperimente (LDLD, LDLL, LDDD) zu Beginn eine LD-Phase untersucht. Zudem wurden auch zwischen den drei Zeitreihen - abgesehen vom Belichtungszyklus - möglichst identische Anzuchtbedingungen gewählt, was durch die ähnlichen Pigment- und Proteingehalte belegt werden konnte (Abbildung 2-13). Die erzielte Verdopplungszeit in der LDLD-Reihe (ca. 80 Stunden) war mit Experimenten vergleichbar, in denen bei photoautotrophem Wachstum in LD (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit) eine zeitliche Koordination in Form von Glykogensynthese und -degradation in *Synechocystis* beobachtet wurde (Verdopplungszeit von ca. 76 Stunden [253]). Auch der Chlorophyllgehalt (bestimmt von Dr. Anne Rediger, [212]) lag in Bezug auf die hier bestimmte Gesamtproteinmenge pro Zelle (2.2.3.1) in einer Größenordnung mit Chlorophyllgehalten, die für die Laborkultivierung von *Synechocystis* publiziert sind [254-256].

Bezogen auf die Zellzahl waren in keiner der drei Zeitreihen signifikante temporäre Schwankungen des Chlorophyllgehalts zu beobachten, wodurch aufgrund des konstanten Verhältnisses von Phycocyanin zu Chlorophyll (Abbildung 2-13) indirekt ein stabiler

Phycocyaningehalt gefolgert werden kann. Wie in Abschnitt 2.2.3.1 dargestellt, schien unter den hier gewählten Bedingungen dennoch eine Regulation in Abhängigkeit vom Licht zu erfolgen: Die Kulturen zeigten nur in den Lichtphasen ein nennenswertes Wachstum, wie es bereits für kontinuierliche und *batch*-Kultivierungen von *Synechocystis* in sinoidalen Hell-Dunkelrhythmen beschrieben wurde [195,257]. In beiden Studien wurde unter moderaten Lichtbedingungen ebenfalls ein konstantes Pigmentverhältnis bzw. Chlorophyllniveau beobachtet [195,257]. Anpassungen des Pigmentgehalts im Verlauf eines LD-Zyklus, wie sie z.B. für *Cyanothece* und *Prochlorococcus* gezeigt wurden [239,252], scheinen in *Synechocystis* demnach unter moderaten Lichtbedingungen nicht erforderlich zu sein. Stattdessen ist davon auszugehen dass die Zellen bei den gewählten Anzuchtbedingungen keinem Stress unterlagen, der oft mit Anpassungen der Photosysteme und Lichtsammelkomplexe einhergeht [195,258].

Waren die biologischen Aktivitäten in *Synechocystis* dennoch auch über das Wachstum hinaus zeitlich strukturiert? Um diese Frage zu beantworten, wurden während der Zeitreihenexperimente (2.2.3.1) und weiterer vergleichbarer Kultivierungen in zweistündigen Intervallen (bzw. kürzeren Abständen beim Übergang von Nacht zu Tag) auch Zellen für RNA-Studien geerntet. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Hess (Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg) erfolgte eine Transkriptomanalyse, deren Resultate zusammen mit den hier beschriebenen physiologischen Daten in *Applied and Environmental Microbiology* veröffentlicht wurden [212]. Durchführung und Auswertung der Untersuchungen auf RNA-Ebene erfolgten primär durch Christian Beck, Dr. Stefanie Hertel und Dr. Anne Rediger.

Interessanterweise schwankte die Menge der isolierten Gesamt-RNA in LDLD, was vor allem auf Veränderungen der Anteile von 16S rRNA und 23S rRNA zurückging. Nach Überführung in LL blieb die rhythmische RNA-Akkumulation aus [212]. Schnelle Anpassungen auf Nukleotidebene sind durchaus auch für *Synechococcus* bekannt: Hier ändert sich die DNA-Topologie in LD beim Anschalten des Lichts innerhalb von 20 Minuten vom *supercoiled* zum relaxierten Zustand [144]. Oszillationen des RNA-Levels in LD wurden bislang jedoch nur in *Synechococcus elongatus* PCC 6301, einem nahen Verwandten von *Synechococcus*, beobachtet [259]. Der RNA-Abbau erfolgte dort allerdings graduell und aufgrund einer im Vergleich zu unserer Studie deutlich erhöhten Zellteilungsrate [259]. Die von uns beobachtete RNA-Akkumulation in der Nacht und rapide Degradation nach Anschalten des Lichts wurde stattdessen als Möglichkeit diskutiert, der Zelle unmittelbar Ribulose-5-Phosphat zur Einspeisung in den Calvin-Zyklus zur Verfügung zu stellen [212].

Die Transkriptomanalysen demonstrierten ein klar gegliedertes Tagesprogramm der *Synechocystis*-Zellen in LDLD, das weit über eine simple Unterteilung in tag- und nachtaktive Gene hinausging [212]: Fast 30 % der durch den *Microarray* erfassten Transkripte zeigten eine zyklische Akkumulation mit über den Tag verteilten Maxima. Dabei war eine signifikante Ko-Regulation funktionell verwandter Gene zu beobachten, deren Aktivierung etwa zu der Tageszeit erfolgte, zu der die Aktivität der kodierten Proteine erwartet wird. Generell schien in Übereinstimmung mit Kucho *et al.* [194] eine Antizipation der kommenden Nachtphase wahrscheinlich, zumal Gene aktiviert wurden, die in katabolische Prozesse und die Respiration involviert sind. Dies ließ die Präsenz eines inneren Zeitgebers vermuten. Nach Überführung in LL und DD blieben die Transkriptszillationen jedoch aus [212]. Somit wurden unter den gewählten Anzuchtbedingungen und relativ strengen Filterkriterien für die Auswertung der Daten (siehe [212]) keine echten circadianen Rhythmen detektiert. In Übereinstimmung mit Labiosa und Kollegen [195] wurde aber eindeutig eine zeitliche Koordination unter den für das natürliche Habitat relevanteren LD-Bedingungen demonstriert.

Dennoch waren die Unterschiede zu *Synechococcus*, wo etwa dreieinhalb Mal so viele Transkripte in LD oszillieren (vergleiche [212] und [21]) und echt circadiane Transkriptrhythmen beschrieben sind [21,27,66], gravierend. Diese Unterschiede basieren vermutlich (zumindest teilweise) auf einem abweichenden Verhalten der *kai*-Genprodukte und dem Fehlen eines TTFL in *Synechocystis*, wie sich in den folgenden Abschnitten erschließen wird.

3.2.3 Das Verhalten der *kai*-Genprodukte unterscheidet sich von den *Synechococcus* Orthologen

Auf Basis der bereits diskutierten Transkriptomanalysen [212] und den Untersuchungen auf Proteinebene (2.2.3) kann ein erstes Bild zur zeitlichen Akkumulation der *kai*-Genprodukte bei langsamem Wachstum unter circadianen und diurnalen Bedingungen gezeichnet werden (Abbildung 3-2). Die Unterschiede zu dem Modellorganismus *Synechococcus* (Vergleiche Abbildung 1-2 und Abbildung 3-2) werden im Folgenden detailliert diskutiert.

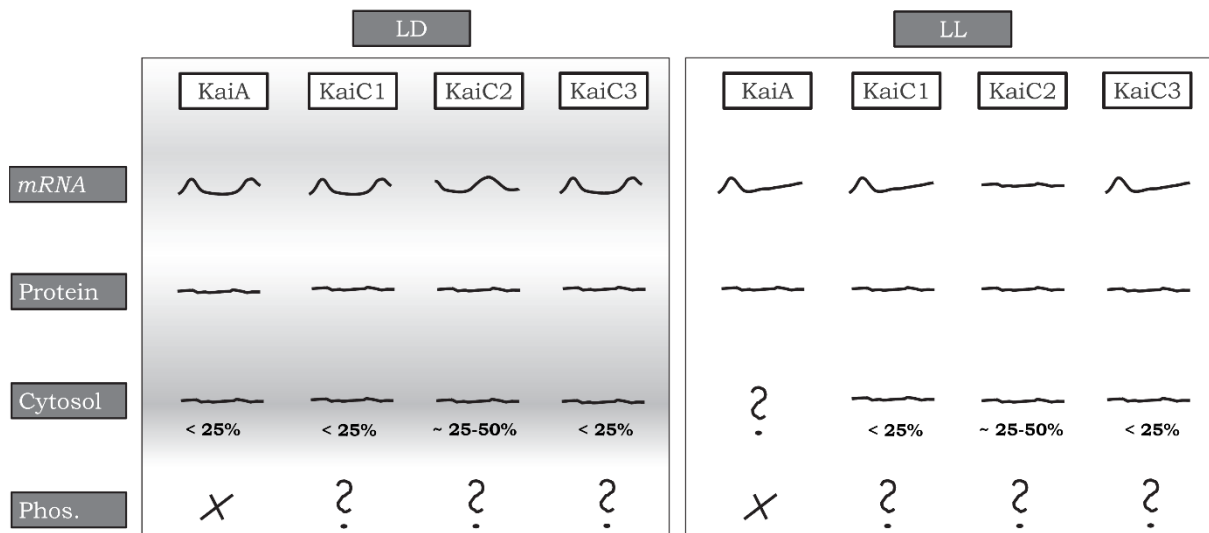


Abbildung 3-2. In vivo Verhalten der *Synechocystis kaiA*- und *kaiC*-Genprodukte bei langsamem, photoautotrophem Wachstum. Die *kai*-Transkripte oszillieren mit geringer Amplitude in LD, zeigen aber keine endogene Rhythmik in LL. Im Gegensatz zu *Synechococcus* liegen KaiA und die KaiC-Proteine sowohl unter diurnalen als auch circadianen Bedingungen konstant und zum Großteil membranassoziiert in der Zelle vor. Der vermutlich stabile cytosolische Anteil der KaiC wurde anhand der Westernblot-Analysen von fraktionierten Extrakten der LDLL-Reihe ermittelt (Abbildung 2-17). Die Lokalisation von KaiA₆₈₀₃ wurde exemplarisch zu zwei Zeitpunkten in LD bestimmt (Abbildung 2-18).

3.2.3.1 Die *kai*-Transkripte zeigen diurnale Oszillationen

Aus den Transkriptomanalysen ergab sich, dass nahezu alle *kai*-mRNAs in LD mit einem Maximum am frühen Morgen oszillierten. Nur *kaiC2* akkumulierte in der Nacht am stärksten (vereinfacht dargestellt in Abbildung 3-2). Vergleichbare Akkumulationsprofile von *kaiA*₆₈₀₃, *kaiC1* und *kaiC3* wurden von Kucho und Kollegen in *Synechocystis* in LL detektiert [194], während die *kaiBC*-Transkripte in *Synechococcus* und *Nostoc* PCC 7120 zur (subjektiven) Dämmerung (in LL bzw. LD) am abundantesten sind [21,23,53,55-58]. Unter unseren Anzuchtbedingungen, wurden jedoch auch die Oszillationen der *kai*-mRNAs nach Überführung in LL oder DD sofort gedämpft.

Gegenüber den Transkripten in *Synechococcus*, war die Amplitude der *kaiA*₆₈₀₃-Oszillation in LDLD erhöht, die der *kaiB1*- und *kaiC1*-Zyklen dagegen deutlich reduziert [21,212], wodurch sich die Amplitude aller *kai*-mRNAs in LDLD auf ein vergleichbar niedriges Niveau annäherte (ca. 0,1-0,2, [212]). Solche Unterschiede zu *Synechococcus* wurden bei der Beschreibung circadianer Rhythmen in *Synechocystis* ebenfalls beobachtet [21,194]. Auch das Expressionsniveau der *kai*-Gene erschien im Vergleich zu *Synechococcus*, wo die *kaiA*₇₉₄₂- und *kaiBC*₇₉₄₂-mRNAs zu den abundantesten Transkripten zählen [260], eher gering [212]: Für eine ausreichende Detektion durch RT-qRT-PCR-Analysen musste im Vergleich zu *Synechococcus*

die doppelte, im Vergleich zu *Prochlorococcus* sogar die 20-fache Gesamt-RNA-Menge eingesetzt werden (Dr. Stefanie Hertel, persönliche Mitteilung und eigene Beobachtungen). Oszillationen mit geringerer Amplitude und einem insgesamt reduzierten Gesamtniveau der *kai*-Transkripte wurden auch in *Nostoc* sp. PCC 7120 beobachtet, in dem nur eine geringe Zahl von Genen circadian exprimiert wird [23].

Fraglich ist ob KaiC1 seine eigene rhythmische Expression steuern kann. Es enthält die dafür wichtigen DXXG-Motive (blauer Kasten in Abbildung 2-4, [53,261]). Seine Genexpression steht im Gegensatz zu dem Homolog aus *Synechococcus* jedoch unter Kontrolle desselben Promotors wie *kaiA₆₈₀₃* [212,262].

3.2.3.2 KaiA₆₈₀₃ und die KaiC-Proteine liegen konstant in der Zelle vor

Zyklische Transkriptszillationen für sich geben aufgrund von posttranskriptioneller und posttranslationaler Regulation nur bedingt Aufschluss über Proteinabundanzen [240,241,244,263]. Für *Synechococcus* ist zudem konkret bekannt, dass die *kaiA₇₉₄₂*- und *kaiBC₇₉₄₂*-Transkripte sowohl in LL als auch LD rhythmisch akkumulieren, translatiertes KaiB₇₉₄₂ und KaiC₇₉₄₂ jedoch in LD nicht oszillieren und KaiA₇₉₄₂ sogar stets konstant vorliegt [21,53-61].

Daher war eine Untersuchung der Kai-Proteinakkumulation in *Synechocystis* notwendig, welche durch die Generierung spezifischer Antikörper ermöglicht wurde (2.2.3.2). Es konnte demonstriert werden, dass sowohl KaiA₆₈₀₃- als auch KaiC1-, KaiC2- und KaiC3 in LL und LD nahezu konstant vorliegen (2.2.3.3). Da in DD keine Transkriptszillationen detektiert wurden [212], wurde auf eine zusätzliche Analyse der Proteinakkumulation in der LDDD-Reihe verzichtet.

Die grob kalkulierten Molekülzahlen von KaiA₆₈₀₃ und KaiC3 bei photoautotrophen Wachstum in LD waren im Vergleich zu KaiA₇₉₄₂ und KaiC₇₉₄₂ bei Wachstum in LL im Schnitt um den Faktor ~7 bzw. ~2,5 erhöht (Vergleiche Abschnitt 2.2.3.5.5 und Kitayama *et al.* [60]). Die im Vergleich zu *Synechococcus* geringere Transkriptmenge (3.2.3.1) spiegelte sich folglich nicht in einer reduzierten Proteinmenge wieder. Darum ist davon auszugehen, dass in *Synechocystis* weitere Regulationsmechanismen greifen, welche die Translationseffizienz beeinflussen. Im Fall von KaiA₆₈₀₃ könnte eine potenziell erhöhte Stabilität des 3'-Endes der mRNA von Bedeutung sein (abzulesen aus Mitschke *et al.* [188]). Zudem wurde eine positive Regulation

durch die *kaiA antisense* RNA vorhergesagt [212]. KaiA₆₈₀₃ akkumulierte jedoch trotz gleicher Transkriptniveaus [212] schwächer als KaiC3. Von Kitayama und Kollegen [60] wurde diskutiert, dass die geringere Expression von KaiA₇₉₄₂ im Vergleich zu KaiC₇₉₄₂ mit dem alternativen Startcodon des *kaiA*₇₉₄₂ (GUG) korreliert. Auch *kaiA*₆₈₀₃ weist als einziges der *Synechocystis kai*-Transkripte ein GUG auf. In Übereinstimmung damit und mit den experimentellen Befunden wird mit *UTR designer* [264,265] für KaiA₆₈₀₃ das niedrigste Expressionslevel aller Kai-Proteine in *Synechocystis* berechnet. Eine experimentelle Validierung der Molekülzahlen der restlichen Kai-Proteine durch Westernblot-Analysen war hier nicht möglich, weil die α -KaiB-Antikörper die entsprechenden Proteine in *Synechocystis* nicht erkannten und KaiC1 und KaiC2 nicht mit zufriedenstellender Homogenität und Stabilität gereinigt werden konnten. Für zukünftige Studien wäre eine massenspektrometrische Quantifizierung denkbar, bei der die Peptide, welche für die Antikörperproduktion synthetisiert wurden (siehe 4.2.3.14), als externe Standards eingesetzt werden.

Anhand der graphischen Darstellung der KaiB₇₉₄₂- und KaiC₇₉₄₂-Molekülzahlen von Kitayama und Kollegen [60] lässt sich eine Amplitude der circadianen Proteinoszillation von ca. 0,25-0,31 berechnen. Demnach ist die Amplitude der Proteinrhythmen gegenüber den Transkriptoszillation etwa um die Hälfte reduziert [21]. Da die Proteinsynthese vorwiegend von der *kai*-mRNA-Akkumulation abhängig ist [57], könnte auch die Amplitude der Proteinoszillationen primär durch die Stärke der Transkriptrhythmen determiniert werden, obschon auch weitere Mechanismen wie zyklische Degradationsraten für die Proteinrhythmen von Bedeutung sind [57]. Sollte die Proteinakkumulation in *Synechocystis* in LD primär von der Amplitude der mRNA-Zyklen abhängen und ebenfalls um die Hälfte reduziert sein, wären nur stark gedämpfte Oszillationen der KaiC-Proteine mit einer Amplitude von 0,05 bis 0,1 zu erwarten (siehe 3.2.3.1). Für KaiC3 wurde tatsächlich eine Amplitude in dieser Größenordnung ermittelt, jedoch als nicht biologisch signifikant gewertet (2.2.3.3). KaiC₇₉₄₂ zeigte in LD vergleichbare Schwankungen mit einer Amplitude von ca. 0,12 (berechnet aus den Molekülzahlen in Qin *et al.* [54]), was von den Autoren ebenfalls als konstant angesehen wurde. In kürzlich publizierten massenspektrometrischen Untersuchungen zur diurnalen Proteinrhythmik in *Synechococcus* wurden erst Oszillationen mit einer minimalen Amplitude von 0,5 als signifikant betrachtet [241]. Insgesamt demonstriert dieser Vergleich, dass die hier etablierte relative Quantifizierung durch Westernblotting sehr sensitiv ist.

Gedämpfte Oszillationen im Kai-Proteinlevel können durch konstante Synthese- und Degradationsraten zustande kommen [57]. Die stabilen Proteinmengen in *Synechocystis* könnten aber auch auf parallelen Oszillationen von Synthese- und Degradation basieren, die sich bezüglich des Netto-Proteinlevels ausgleichen, aber dennoch zur zyklischen Einschleusung unphosphorylierten KaiC am Vormittag führen [54,58]. Dies könnte ausreichen um die Nachtphase zu antizipieren, da zur Erzeugung des circadianen Outputs in *Synechococcus* nicht das gerichtete Durchlaufen der KaiC₇₉₄₂-Phosphorylierungsstufen *per se*, sondern die veränderte Abundanz bestimmter Phosphorylierungsstufen entscheidend zu sein scheint [123]. Um Rückschlüsse über das Vorhandensein „versteckter“ Proteinoszillationen in *Synechocystis* zu ziehen, sollte in zukünftigen Studien die Proteinsynthese analog zu Imai *et al.* [57] durch Westernblots nach Aufnahme von [³⁵S]-Methionin bestimmt werden (sofern diese nicht wie die Leucinaufnahme zyklisch erfolgt [34]). Aussagen zur Kai-Proteinstabilität erlauben Westernblot-Analysen nach Chloramphenicol vermittelter Inhibition der Translation [57]. Im Zusammenhang mit der Proteinsynthese stellt sich vor allem die Frage ob aus den Zeitunterschieden der maximalen *kai*-mRNA-Akkumulation in *Synechocystis* und *Synechococcus* (s.o.) auch eine Verschiebung potenzieller KaiB- und KaiC-Maxima resultiert. Solch eine Verzögerung zwischen RNA- und Proteinakkumulation wurde z. T. in *Prochlorococcus marinus* MED4 und *Cyanothece* ATCC 51142 beobachtet [240,244].

3.2.3.3 Bei langsamem Wachstum zeigen die KaiC-Proteine keine deutlichen Phosphorylierungszyklen

In den Gesamtzellextrakten der LDLL-Reihe wurde keine deutliche Phosphorylierung aufgelöst (2.2.3.6). Gelanalysen von cytosolischen Proteinen aus der LDLL-Reihe ließen jedoch in Übereinstimmung mit der *in vitro* detektierten Kinase-Aktivität eine geringe Phosphorylierung von KaiC1 und KaiC3 vermuten (2.2.3.6). Zur Validierung könnten potenzielle Phosphatgruppen an den KaiC-Proteinen nach elektrophoretischer Auftrennung mit dem Farbstoff *Pro-Q Diamond*, der auch von Mikkat und Kollegen verwendet wurde [229], oder dem etwas weniger sensitiven, aber kostengünstigeren Quercetin (3,5,7,4,5-Pentahydroxyflavon) fluoreszenzbasiert dargestellt werden. Da in dieser Arbeit keine deutlichen Phosphorylierungsrhythmen detektiert wurden und auch KaiC₇₉₄₂ an der Membran primär dephosphoryliert vorliegt, drängt sich jedoch die Vermutung auf, dass die Phosphorylierung aufgrund der Membranassoziation unterdrückt war.

3.2.3.4 Lokalisation der Kai-Proteine

Der Hauptteil aller KaiC-Proteine war unter den hier getesteten Bedingungen fest an Membranen assoziiert (2.2.3.4 und 2.2.3.5.2). Durch die TEM-Analysen nach Immunogold-*Labeling* konnte der membranständige Teil von KaiA₆₈₀₃ und KaiC3 den Thylakoidmembranen zugordnet werden (in der Mitte der Nacht, 2.2.3.5.3). Zudem suggerierten die Analysen, dass ein Teil des KaiC1 an der Cytoplasmamembran vorlag (2.2.3.5.4). Dies sollte z.B. durch die Separation von Thylakoid-, Cytoplasma- und äußerer Membran durch Trennung in einem wässrigen Polymer-Zweiphasen-System in Kombination mit einem Saccharose-Gradienten [266-269] und anschließende Westernblot-Analysen weitergehend untersucht werden.

Cohen *et al.* [62] beschrieben kürzlich die zeitlich regulierte Assoziation von KaiC₇₉₄₂ an die Thylakoidmembranen in der Nähe eines der Zellpole von *Synechococcus*-Zellen. KaiC₇₉₄₂ fokussierte dort nachts in der Dephosphorylierungsphase und Protein-Varianten, die die KaiC₇₉₄₂-Zustände während der Dephosphorylierung nachahmen (KaiC₇₉₄₂-AA, KaiC₇₉₄₂-ET), wiesen die stärkste Assoziation auf [62]. Es wurde diskutiert, dass KaiC₇₉₄₂ im Grundzustand an der Membran verbleibt und erst durch zusätzliche Faktoren tagsüber im Cytosol verteilt wird. Diese cytosolische Lokalisation scheint für den KaiC₇₉₄₂-Phosphorylierungszyklus nötig zu sein [60], der die Feedbackkontrolle auf den *kaiBC*-Promotor ausübt [53,56,129,130]. Der TTFL wiederum ist für die Lokalisation des KaiC₇₉₄₂ erforderlich [62]. Dass in *Synechocystis* weder Hinweise für einen klaren TTFL noch zyklische Lokalisationen gefunden wurden, untermauert, dass beide Aspekte stark miteinander verzahnt sind.

Fraglich ist, welcher Mechanismus die Kai-Proteine an der Membran verankert. Weder in den Sequenzen der Kai-Proteine aus *Synechocystis* noch jener der Homologe aus *Synechococcus* wurden mit den *Onlinetools* HMMTOP und Predict Protein Open Transmembranhelices erkannt und darum für alle Proteine eine cytosolische Lokalisation vorhergesagt [270-273]. Eine Membranassoziation trotz Abwesenheit eindeutiger Membranhelices ist aber durchaus bekannt: Durch Proteomanalysen isolierter Thylakoidmembranen wurden 52 Thylakoid-assoziierte Proteine identifiziert, die ebenfalls keine Membranhelices oder Signalpeptide enthalten [274]. Da KaiC₇₉₄₂ auch bei Expression in *E. coli* in der Nähe eines der Pole lokalisierte, ist davon auszugehen, dass für die Fokussierung keine zusätzlichen Faktoren nötig sind, die ausschließlich in Cyanobakterien vorkommen [62]. KaiA₇₉₄₂ ko-lokalisierte mit KaiC₇₉₄₂ durch die Assoziation an dessen C-Terminus [62]. Daher wäre es möglich, dass KaiA₆₈₀₃- ebenfalls aufgrund der Interaktion mit KaiC1 an den Membranen gefunden wurde.

Es stellt sich aber die Frage, warum KaiA₆₈₀₃ so viel fester assoziierte als KaiA₇₉₄₂ (vergleiche Abschnitt 2.2.3.5.2 und Kitayama *et al.* [60]). Klarheit darüber ob KaiA₆₈₀₃ unabhängig von KaiC1 an die Membran bindet, könnten Untersuchungen nach Expression in *E. coli* sowie die Analyse der KaiA-Lokalisation in *kaiBC*-oder *kaiC*-Deletionsstämmen liefern. Hier können die in dieser Arbeit angewendeten Verfahren methodisch durch die in Cohen *et al.* dargestellte mikroskopische Analyse von Fluorophor-Fusionsproteinen ergänzt werden. Die Modifikation der Proteine durch Fusion mit Fluorophoren birgt jedoch immer die Gefahr einer Beeinflussung von Lokalisation und Funktion, weswegen die hier etablierten Methoden unbedingt parallel eingesetzt werden sollten. Alternativ wäre die Untersuchung der nativen Proteine in seriellen Dünnschnitten durch TEM zur Erstellung eines 3D-Models möglich [275]

Auch über die augenscheinlichen verschiedenen Zellformen hinaus weisen *Synechocystis* (sphärisch) und *Synechococcus* (stäbchenförmig) wichtige strukturelle Unterschiede auf. In *Synechocystis* bilden die Thylakoidmembranen gestapelte z. T. isolierte Membranblätter unterschiedlicher Größe, die meist parallel zur Cytoplasmamembran verlaufen, aber auch in irregulären Schleifen in die Zelle ragen können [275,276]. Die Membranblätter treffen im Schnitt an fünf Punkten nahe der Cytoplasmamembran zusammen, wodurch im Querschnitt unterbrochene Ringe zu sehen sind [276,277]. Diese Struktur wurde bei TEM-Aufnahmen der Zellen des *Synechocystis* Wildtyps sowie der *Synechocystis kaiABC*- und *kaiC3*-Deletionsmutanten ebenfalls beobachtet (z. B. Abbildung 2-20). In *Synechococcus* werden die Thylakoidmembranen dagegen aus einem zusammenhängenden, perforierten System konzentrischer Hüllen gebildet, die entlang der Cytoplasmamembran angeordnet sind und das zentrale Lumen umschließen [278,279]. Die Zellteilung erfolgt in *Synechocystis* meist perpendicular zur vorherigen Teilungsebene und kann bereits starten bevor die vorherige Zellteilung abgeschlossen ist [276,280]. *Synechococcus* teilt sich indes stets in der Mitte der Zelle, quer zur Längsachse [281]. Während die Zellteilung in *Synechococcus* durch die circadiane Uhr reguliert ist [28,29,31], wurde bei den Zeitserienexperimenten (2.2.3.1) keine Synchronisierung in *Synechocystis* beobachtet (nicht gezeigt). Sowohl in *Synechococcus* als auch *Synechocystis* weisen die Thylakoidmembranen eine Heterogenität auf, die durch eine differenzielle Verteilung der Photosysteme und bestimmter Proteine gekennzeichnet ist [282-284]. So soll der Chinon-Pool in *Synechococcus* an den Polen angereichert sein [62]. Cohen und Mitarbeiter diskutierten darum, dass KaiC₇₉₄₂ dort lokalisiert sein könnte, um dem *Entrainment* durch oxidiertes Plastochinon (Siehe Einleitung, 1.3.5) zugänglich zu sein [62]. Da die Zellpole in *Synechocystis* mit jeder Zellteilung neu definiert werden und die

Thylakoidmembranen z. T. isoliert vorliegen, ist eine diffusere Verteilung des Chinon-Pools anzunehmen. Eine Verankerung der Kai-Proteine in räumlicher Nähe zu den Plastochinonen ist daher auch in *Synechocystis* durchaus denkbar. Zeitlich aufgelöste Ko-Lokalisationsstudien mit Komponenten des Cytochrom-b₆f-Komplexes, der Photosysteme oder auch dem Homolog von CikA, das in *Synechococcus* ebenfalls an den Polen lokalisiert [62], könnten hier weitere Aufschlüsse liefern.

Interessanterweise war die Fokussierung von KaiC₇₉₄₂ an den Zellpolen in *E. coli* wachstumsabhängig und in der stationären und lag-Phase am stärksten [62]. In Anbetracht der sehr geringen Teilungsraten von *Synechocystis* bei den in dieser Arbeit gewählten Kultivierungsbedingungen stellt sich die Frage, inwiefern kürzere Verdopplungszeiten die Lokalisation der Kai-Homologe beeinflussten. Bei mixotrophem Wachstum und - damit einhergehend - höheren Wachstumsraten deutete sich eine leichte Erhöhung des cytosolischen Anteils der Kai-Proteine an (2.2.3.5.2). Ob diese leicht veränderte Verteilung in der Zelle biologisch signifikant ist und mit einem erhöhten Wachstum oder aber dem generell veränderten Stoffwechsel einhergeht, gilt es zu überprüfen.

3.2.4 Schlussbetrachtung - Konditionelle circadiane Rhythmik in *Synechocystis*?

Insgesamt ergibt sich aufgrund der hier durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Studien folgendes Bild: KaiA₆₈₀₃, KaiB1 und KaiC1 sollten zur Generierung 24-stündiger Oszillationen fähig sein, die ggf. durch KaiC3 aufgrund seiner modifizierten Enzymaktivitäten beeinflusst werden. Da KaiC3 weder Interaktionen mit KaiA₆₈₀₃ noch mit den anderen KaiC-Homologen aufweist, kommt nur eine Verknüpfung über die KaiB-Proteine oder bisher unbekannte Faktoren in Frage. Vermutlich wurden die Phosphorylierungsrhythmen des KaiC1 jedoch aufgrund der starken Membranassoziation von KaiA₆₈₀₃ und KaiC1 unter unseren Wachstumsbedingungen unterdrückt. Der PTO ist in *Synechococcus* essenziell, um die Zeit während der Nacht zu messen und dadurch die Lichtphase zu antizipieren [123]. Daher konnten die Zellen in Abwesenheit der Phosphorylierungszyklen zwar die Nachtphase vorhersehen, zeigten aber keine circadiane Rhythmik.

Andere Gruppen demonstrierten circadiane Oszillationen in *Synechocystis* [35,191-194,196]. Warum wurde bei den hier beschriebenen Kultivierungsbedingungen dennoch keine circadiane Transkript- und Proteinakkumulation beobachtet? Naheliegend wäre der Verlust der circadianen Rhythmik in dem hier verwendeten Laborstamm infolge eines mangelnden

rhythmischen Selektionsdrucks während der Laborlagerung. Da der Stamm jedoch über Jahre in Tag/Nacht-Rhythmen gelagert wurde (Prof. Dr. Annegret Wilde, persönliche Mitteilung) und die Deletion von *kaiAB1C1* zu einem Wachstumsnachteil in LD führt [207], erscheint solch eine evolutive Anpassung an Dauerlichtbedingungen unwahrscheinlich. Zudem lassen sich Mutationen in den *kai*-Genen und den flankierenden Bereichen ausschließen, da der verwendete Stamm kurz zuvor re-sequenziert wurde (GeneBank accession number CP003265, [186,285]).

Stattdessen verdichten sich Hinweise darauf, dass das hier gewählte, sehr langsame photoautotrophe Wachstum in Abwesenheit von Stressoren einen Einfluss auf Expression und Verhalten der *kai*-Genprodukte ausübte. Möglich wäre, dass *Synechocystis* die Fähigkeit besitzt, die circadiane Regulation in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen an- und abzuschalten (konditionelle circadianen Rhythmik, [286]).

Für *Synechococcus* ist nachgewiesen, dass die circadiane Uhr unter bestimmten Bedingungen von Nachteil ist. Zum einen bieten die intrinsischen Oszillationen *Synechococcus* bei 30 °C nur dann einen kompetitiven Fitnessvorteil, wenn deren Periode mit den Umgebungsrhythmen übereinstimmt [5]. Zum anderen stellen robuste circadiane Oszillationen bei niedrigen Temperaturen (18-20 °C) einen Wachstumsnachteil dar und werden darum gedämpft [286]. Dabei spielt die nicht optimale *codon usage* der *kai*-Gene eine entscheidende Rolle, da sie eine Justierung des KaiB₇₉₄₂- und KaiC₇₉₄₂-Levels durch post-transkriptionelle Mechanismen ermöglicht [286]. Auch der *codon adaptation index* [287] aller *kai*-Gene aus *Synechocystis* liegt im Bereich der mittleren *codon usage* in diesem Organismus (ermittelt mit dem *Onlinetool JCat* [288]). Die *kai*-Gene sind demnach ebenfalls nicht für eine starke Proteinexpression optimiert. Stattdessen implizieren die obigen Betrachtungen eine post-transkriptionelle Regulation, die das konstante Proteinlevel und – vermutlich im Zusammenspiel mit der Membranassoziation – letztendlich die Abwesenheit circadianer Rhythmen verursachte. *Cyanothece* sp. ATCC 51142 zeigt circadiane und ultradiane Rhythmen, deren gegenseitige Dominanz durch die Lichtintensität, CO₂-Verfügbarkeit und Anwesenheit von Glucose beeinflusst wurden [171,172,289]. In *Crocospaera watsonii* WH 8501 wird die diurnale Chromosomenkondensierung durch die Lichtintensität moduliert [24]. In *Synechocystis* waren die Biolumineszenzrhythmen eines *dnaK-luxAB*-Reporterstamms bei Kultivierung in Flüssigmedium weniger robust als bei Wachstum auf Agarplatten [196]. Dies demonstriert, dass die Kultivierung eine entscheidende Rolle für die Robustheit der Oszillationen spielt. Circadiane Rhythmen der photosynthetischen Aktivität wurden bei exponentiellem Wachstum

gefunden [35]. Ggf. bedarf *Synechocystis* erst bei diesem beschleunigten Wachstum oder unter Stressbedingungen einer endogenen zeitlichen Koordinierung, während bei langsamem Wachstum der Verzicht auf robuste Oszillationen energieeffizienter ist. Möglich wäre, dass eine Erhöhung der *kai*-Transkriptlevel, gesteigerte Amplituden der *kai*-mRNA-Oszillationen oder das Loslösen der Kai-Proteine von den Membranen unter alternativen Wachstumsbedingungen circadiane Oszillationen hervorrufen können.

Für die Abhängigkeit vom Wachstum könnte auch die Genomkopienzahl und Entfernung der *kai*-Gene vom Replikationsursprung auf dem Chromosom (OriC) von Bedeutung sein. Gene nahe des OriC liegen aufgrund der häufigeren Replikation in höheren Kopienzahlen vor als OriC-ferne Gene, was eine stärkere Abhängigkeit der Expression vom Wachstum bedingt [290,291]. Interessanterweise ist die absolute Entfernung vom OriC der Standard *kaiABC*-Cluster in *Synechococcus*, *Cyanothece* ATCC 51142 und *Nostoc* sp. PCC 7120, in denen echt circadiane Transkriptszillationen nachgewiesen wurden [21,23,24,26,27,29-31,35,66,143,171,172] sehr ähnlich (ca. 1,25, 1,45 bzw. 1,12 Megabasen, ermittelt anhand der Angaben in der Datenbank *DoriC* [292-294], Referenzen 295,296 sowie *Cyanobase* [198]). Interessanterweise ist das *kai*-Gencluster in *Synechococcus* dabei nahezu weitest möglich vom OriC entfernt. Davon lässt sich eine theoretische Unabhängigkeit vom Wachstum ableiten, zumal auch die Chromosomenzahl unbeeinflusst vom Wachstum zu sein scheint [169]. In *Synechocystis* liegt das *kaiABICI*-Cluster hingegen nur etwa 0,46 Megabasen vom OriC entfernt [292,293], was der Distanz des *kaiBC*-Clusters in *Prochlorococcus marinus* MED4 (0,36 Megabasen), einem Vertreter ohne circadiane Transkriptzyklen [40], nahe kommt (Entfernungen jeweils ermittelt anhand der Angaben in *DoriC* [292-294] und der *Cyanobase* [198]). Aufgrund der stark wachstumsabhängigen Genomkopienzahl [169] in *Synechocystis* könnte die Position des *kaiABICI*-Clusters demnach eine starke Korrelation von dessen Expression mit der Teilungsrate hervorrufen. Die restlichen *kai*-Gene wären aufgrund größerer Entfernungen weniger vom Wachstum beeinflusst. In vorläufigen Untersuchungen wurden in LDLL unter Wachstumsbedingungen, die mit den in Abschnitt 2.2.3.1 dargestellten Zeitserien vergleichbar sind, nur ca. 21-26 fg DNA pro Zelle isoliert, was etwa 5-7 Genomkopien entspricht (nicht gezeigt). Sollte die *kai*-Expression tatsächlich von der Gendosis abhängen, könnte die von uns beobachtete geringe Transkriptmenge auch im Vorhandensein sehr weniger Chromosomenkopien begründet liegen. Da von Griesse und Kollegen jedoch mindestens 58 Genomkopien pro Zelle detektiert wurden [169], muss noch überprüft werden ob die DNA-

Ausbeute bei der gewählten Methode limitiert war, oder ob tatsächlich aufgrund der im Vergleich zu Griesse *et al.* reduzierten Wachstumsrate eine geringere Chromosomenzahl vorlag.

Um die Hypothese einer konditionellen circadianen Rhythmik zu untermauern, sollte das rhythmische Verhalten eines Promotors (z. B. *dnaK* [191]) in einem Reporterstamm oder die Sauerstofffreisetzung im Wildtyp [35] vergleichend bei langsamem und schnellem Wachstum, sowie unter verschiedenen Stressbedingungen analysiert werden. Da die Deletion von *kaiABIC1* bei mixotropher Kultivierung gravierendere Wachstumsdefizite als bei photoautotropher Kultivierung verursachte [207] und bei mixotrophem Wachstum ggf. geringfügige Modulationen der Pigmentlevel (als Stressanpassung) erfolgten (2.2.3.5.1), erscheint schnelles Wachstum in Anwesenheit von Glucose oder bei Begasung mit CO₂-angereicherter Luft besonders interessant. Anhaltspunkte für relevante Stressbedingungen könnten Transkriptomdaten der Gruppe von Prof. Dr. Wolfgang Hess liefern, die z.B. eine erhöhte Expression aller *kai*-Gene bei niedrigen Temperaturen (15 °C) demonstrierten [262].

4. Material und Methoden

4.1 Material

In diesem Kapitel sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte und Materialien aufgeführt. Ausgenommen sind allgemeine Labor- und Verbrauchsmaterialien, wie z. B. Glas- und Reaktionsgefäße, Petrischalen oder Parafilm.

4.1.1 Technische Laborgeräte

Tabelle 4-1 listet die in dieser Arbeit verwendeten Geräte auf.

Tabelle 4-1. Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Gerätetyp, Hersteller
Aquarien-Durchlüfterpumpe	Shego Optimal, Shego, Offenbach
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator Typ 400, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Blaulichttisch	peqlab ECX-F20: SKYLIGHT, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Brutschrank	B 6200, Heraeus, Hanau
Eisbereiter	Scotsman AF 103, Mailand, Italien
Flachbettschüttler	Celloshaker Variaospeed, Renner GmbH, Dannstadt-Schauernheim Edmund Bühler Swip KL-2, Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Gasbrenner	Gasprofi 1 SCS micro, WLD-Tec GmbH, Göttingen
Geldokumentationssystem	Gel iX system, Intas, Göttingen Molceular Imager® ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad, München
Geltrockner	Bio-Rad Gel Dryer 583, Bio-Rad, München
Horizontale Gelelektrophorese-Kammern (für Agarosegele)	Bio-Rad-Mini Sub DNA-Cell, München PerfectBlue Gelsystem Mini S und M, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
HPLC	Knauer HPLC (solvent organizer K-1500, pump K-1001, UV detector K-2600), Knauer, Berlin
Klimaschrank	Sanyo Versatile enviromental Test Chamber MLR 351 und MLR 352, Panasonic, Bad Nenndorf
Kühlbare Tischzentrifugen	Hettich Zentrifuge Mikro 200R, Hettich Lab Technology, Tuttlingen

Gerät	Gerätetyp, Hersteller
	Eppendorf Centrifuge 5424 R, Eppendorf AG, Hamburg
Laborwaagen	BP 310 S und VWR1502, Sartorius AG, Göttingen Denver Instruments SI - 234 A, Sartorius AG, Göttingen
Lichtstärkemessgerät	190SA-Sensor, Li-Cor, Bad-Homburg
Magnetrührer	Heidolph MR 3000, Schwabach
Mikroskope	Zeiss Axiolab, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena JEOL JEM-1230 Electron Microscope, JEOL, Welwyn Garden City, UK
PCR-Thermocycler	T-Personal, Biometra, Göttingen Peqlab primus 25 advanced, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Phospho-Imager	Personal Molecular Imager FX, Bio-Rad, München
Rotationsschüttler	Intelli Mixer RM-2M, ELMI Ltd, Riga, Litaun Stuart Rotator SB3, Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, UK
Schüttelinkubator	New Brunswick Excella E24 Incubator, Eppendorf, Hamburg G25 Incubator Shaker, New Brunswick, Edison, USA
<i>Semidry-Blotting-Apparatur</i>	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad München
Spannungsquellen	PowerPac 300, Bio-Rad, München (vertikale Mini-Gel- und horizontale Gelelektrophoresesysteme) PowerPac 3000 xi und Powerpac Universal Power Supply, Bio-Rad, München (Bio-Rad Protean II Gelelektrophoresesystem); PowerPac HC, Bio-Rad, München (Semidry-Blotting Apparatur)
Spektrophotometer	Novaspec III Visible Spectrophotometer, GE Healthcare, München NanoDrop ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer, Peqlab Biotechnologie, Erlangen Specord 200 plus, Analytic Jena, Jena
Sterilwerkbank	Haereaus Lamin Air, Hanau BioWizard Silver SL 130, Kojair Tech Oy, Vilppula, Finnland
Thermoblock/-mixer	Thermomixer 5436 und 5437, Eppendorf AG, Hamburg Lab4you, CH-100, Lab4you GmbH, Berlin BIOER Mixing Block MB-102, BIOER, Hangzhou, China
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415C, Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf 5418, Eppendorf AG, Hamburg, Eppendorf 5424, Eppendorf AG, Hamburg

Gerät	Gerätetyp, Hersteller
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls Bandelin, (Titan-Sonotrode/Kegelspitze KE76), Berlin
UV-Transilluminator	TFX-35M Ultraviolet UV Transilluminator, Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
vertikale Gelelektrophorese-kammern (Für PAA-Gele)	Hoefer SE 260 Mighty Small, Amersham Bioscience, Freiburg bzw. SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg Protean II xi, Bio-Rad München Mini-Protean II, Bio-Rad, München peqlab Twin ExW, Peqlab Biotechnologie GmbH, Tuttlingen
Vortexer	Reax2000, Heidolph, Schwabach
Wasserbäder	MA6, Lauda, Dr. R. Wobeser, Lauda-Königshofen Julabo SW20, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach GFL-1086, GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zellmühle	Typ MM2, MM301, Reetsch, Haan
Zentrifugen	RC 5B Plus und RC 6 Plus; Sorvall, DuPont, Bad Homburg (Rotoren SS34, SLA-1000, SLA-1500) Beckmann Coulter Alegra X-22R, Beckmann, München (Rotor SX4250)

4.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Lösungsmittel, Feinchemikalien und Gebrauchslösungen wurden von folgenden Lieferanten bezogen:

Tabelle 4-2. Lieferanten von Lösungsmitteln, Feinchemikalien und Gebrauchslösungen

Lieferant	Ort
Biozym	Hessisch Oldendorf
Boehringer	Mannheim
Carl Roth	Karlsruhe
Difco	Detroit, USA
Merck Milipore	Darmstadt
neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH	Heidelberg
Nippon Genetics Europe GmbH	Düren

Lieferant	Ort
Roche	Mannheim
Serva	Heidelberg
Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Thermo Scientific	St. Leon Roth

4.1.3 Radiochemikalien

Nachstehende Radionukleotide wurden von der Firma Hartman Analytic GmbH (Braunschweig) bezogen:

- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, spezifische Aktivität: 6.000 Ci/mmol
- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ADP}$, spezifische Aktivität: 3.000 Ci/mmol

4.1.4 Mikroorganismen

4.1.4.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Tabelle 4-3 nennt die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme:

Tabelle 4-3. Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Verwendung	Hersteller/Referenz
NEB 5- α lpha (DH5 α -Derivat)	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA</i> <i>glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i>	Klonierungsarbeiten	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Arctic Express (DE3)	<i>E. coli</i> B F- <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (rB- mB-) <i>dcm</i> + Tetr gal λ (DE3) <i>endA</i> Hte [cpn10cpn60 Gentr]	Proteinexpression	Agilent, Santa Clara, USA
BL21 (DE3)	<i>fhuA2</i> [<i>lon</i>] <i>ompT</i> gal (λ DE3) [<i>dcm</i>] Δ <i>hsdS</i> , λ DE3 = λ <i>sBamHI</i> o Δ <i>EcoRI</i> - <i>B</i> int::(<i>lacI</i> :: <i>PlacUV5</i> :: <i>T7 gene1</i>) <i>i21</i> Δ <i>nin5</i>	Proteinexpression	Studier & Moffatt (1986)
DH5 α	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk'-, mk+), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA</i> , <i>phoA</i> (phi) 80d <i>lacZ</i> (DM15)D(<i>lacZYA-argF</i>) U1690	Klonierungsarbeiten	Hanahan 1983

Stamm	Genotyp	Verwendung	Hersteller/Referenz
NEB Express (BL21-Derivat)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	Klonierungsarbeiten und Proteinexpression	New England Biolabs, Frankfurt am Main

4.1.4.2 Cyanobakterien

Der in dieser Arbeit untersuchte *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp-Stamm wurde ursprünglich von der Arbeitsgruppe von Prof. Sergey V. Shestakov (Lehrstuhl für Genetik, Staatliche Universität Moskau, Russland) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um den Glucose-toleranten motilen Wildtyp-Stamm „PCC-M“, der 2012 resequenziert wurde [186]. Die Sequenzinformation sind unter der *GeneBank accession number* CP003265 verfügbar [285].

Folgende *Synechocystis*-Mutanten wurden verwendet:

Tabelle 4-4. *Synechocystis*-Mutanten

Mutante	Beschreibung	Referenz
<i>Synechocystis</i> <i>ΔkaiAB1C1</i>	Insertion einer Kanamycin-Resistenzgenkassette in das <i>kaiAB1C1</i> -Cluster (<i>slr0756</i> , <i>slr0757</i> , <i>slr0758</i>) von <i>Synechocystis</i>	Dörrich <i>et al.</i> [207]
<i>Synechocystis</i> <i>ΔkaiC3</i>	Insertion einer Chloramphenicol-Resistenzgenkassette in das <i>kaiC3</i> -Gen (<i>slr1942</i>) von <i>Synechocystis</i>	Dörrich <i>et al.</i> [207]

4.1.5 Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotide für Amplifikationen, ortsgerichtete Mutagenesen, Kolonie-PCRs sowie Sequenzierungen wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim) in lyophilisierter Form bezogen und in dH₂O zu einer Endkonzentration von 100 μM gelöst. In Tabelle 4-5 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Dabei sind Erkennungssequenzen für die im Namen des Primers genannten Restriktionsendonukleasen einfach unterstrichen. Bei Oligonukleotiden, die für eine ortsgerichtete Mutagenese verwendet wurden, sind die Basen, die in der Zielsequenz ausgetauscht wurden, doppelt unterstrichen.

Tabelle 4-5. Verwendete Synthetische Oligonukleotide

Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
1	fw-kaiA ₆₈₀₃ -BamHI	TGATCCGGATCCCAGTCTCCCCTCTC	PCR
2	rev-kaiA ₆₈₀₃ -NotI	ACCGTAGCGGCCGCTTATTAATCCGTC	PCR
3	fw-kaiB1-BamHI	CCCGTGGATCCAGCCCCTTTAAAAAACT	PCR
4	rev-kaiB1-NotI	CCTGGCGGCCGCTTTTCTATTGGTC	PCR
5	fw-kaiC1-BamHI	CTAGGGATCCAACTTACCGATTGTTAACG	PCR
6	rev-kaiC1-NotI	GAAAGTGCGGCCGCTTTCAATCCTACTC	PCR
7	fw-kaiB3-BamHI	GTTATCAGGATCCGATATGAATAGGATTGTG	PCR
8	rev-kaiB3-NotI	CTAGGGGCGGCCGCTTAATCCTCC	PCR
9	fw-kaiC3-BamHI	GCAGTGAAGGATCCATCGACCAAGAGAC	PCR
10	rev-kaiC3-NotI	GTTTACAAGCGGCCGCAATTGACTATATTTTC	PCR
11	pGEX 5'	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGG	Sequenzierung
12	pGEX 3'	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	Sequenzierung
13	SQ-kaiC1_431-52fw	CCATTGATTCGGTCACAGCGGT	Sequenzierung
14	fw-kaiC1-NdeI	CTAGCATATGAACTTACCGATTGTTAACG	PCR
15	rev-kaiC1-AvrII	CTTTCCTAGGCTACTCAGCGGTCT TGT	PCR
16	pCOLD F primer	ACGCCATATCGCCGAAAGG	Sequenzierung
17	pCOLD R primer	TCCCCGCCAAATGGCAGGGA	Sequenzierung
18	rev-kaiC1-XhoI	CAATCCTACTCGAGGGTCTTGTC	PCR
19	T7 Promotor Primer	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung
20	rev-Seq-intein	ACCCATGACCTTATTACCAACCT	Sequenzierung
21	fw-kaiC1-BamHI-Duet	CTTAGGATCCGAACTTACCGATTGTTAAC	PCR
22	T7 Terminator Primer	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenzierung
23	fw-QC-kaiC3-AA	GGGGAGCTTCCATTACCGATGCCCATATTGCAGC AATTACCGATTTCG	Mutagenese
24	rev-QC-kaiC3-AA	CGAATCGGTAATTGCTGCAATATGGGCATCGGTA ATGGA AGCTCCCC	Mutagenese

Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
25	fw-QC-kaiC3-DE	GGGGAGCTTCCATTACCGATGCCCATATT <u>GACGA</u> <u>A</u> ATTACCGATTCTG	Mutagenese
26	rev-QC-kaiC3-DE	CGAATCGGTAATTT <u>CGTCA</u> ATATGGGCATCGGTA ATGGAAGCTCCCC	Mutagenese

4.1.6 Plasmide

In Tabelle 4-6 sind die verwendeten Plasmide aufgeführt. Die Konstruktion der im Rahmen dieser Arbeit generierten Plasmide wird in den Abschnitten 4.2.2.11-4.2.2.15 beschrieben.

Tabelle 4-6. Liste der verwendete Plasmide

Plasmid	Verwendungszweck	Hersteller/Referenz
pACYC-Duet	Klonierung	Merck Millipore, Darmstadt
pACYC-Duet-kaiC1	heterologe Expression von His-KaiC1	Diese Arbeit
pCOLA-Duet	Klonierung	Merck Millipore, Darmstadt
pCOLA-Duet-kaiC1	heterologe Expression von His-KaiC1	Diese Arbeit
pCOLDI	Klonierung	Takara Clonotech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
pCOLD-kaiC1	heterologe Expression von His-KaiC1	Diese Arbeit
pGEX-kaiA ₆₈₀₃	heterologe Expression von GST-KaiA ₆₈₀₃	Diese Arbeit, Wiegard <i>et al.</i> [183]
pGEX-kaiA ₇₉₄₂	heterologe Expression von GST-KaiA ₇₉₄₂	Prof. Dr. Takao Kondo, Nagoya University, Japan
pGEX-kaiB1	heterologe Expression von GST-KaiB1	Diese Arbeit
pGEX-kaiB2	heterologe Expression von KaiB2	Anja K. Dörrich, Justus-Liebig-Universität Gießen, unveröffentlicht
pGEX-kaiB3	heterologe Expression von GST-KaiB3	Diese Arbeit
pGEX-kaiB ₇₉₄₂	heterologe Expression von GST-KaiB ₇₉₄₂	Prof. Dr. Takao Kondo, Nagoya University, Japan
pGEX-kaiC1	heterologe Expression von GST-KaiC1	Diese Arbeit, Wiegard <i>et al.</i> [183]
pGEX-kaiC3	heterologe Expression von GST-KaiC3	Diese Arbeit, Wiegard <i>et al.</i> [183]
pGEX-kaiC3-AA	heterologe Expression von GST-KaiC3-AA	Nancy Sauer, Bachelorarbeit [297]

Plasmid	Verwendungszweck	Hersteller/Referenz
pGEX-kaiC3-DE	heterologe Expression von GST-KaiC3-DE	Nancy Sauer, Bachelorarbeit [297]
pGEX-kaiC ₇₉₄₂	heterologe Expression von GST-KaiC ₇₉₄₂	Prof. Dr. Takao Kondo, Nagoya University, Japan
pJET1.2	blunt-Klonierungen	Thermo Scientific, St. Leon Roth
pTYB2	Klonierung	New England Biolabs, Frankfurt am Main
pTYB2-kaiC1	heterologe Expression von KaiC1-intein	Diese Arbeit
puC19	Kontrolle der Transformationseffizienz	New England Biolabs, Schwalbach

4.1.7 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für die Immuno-Detektion im Rahmen von Westernblot-Studien (WB, 4.2.3.12) und TEM-Analysen (TEM, 4.2.3.13) verwendet.

Tabelle 4-7. Liste der genutzten Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Hersteller
α -KaiA	Kaninchen IgG, gerichtet gegen denaturiertes KaiA ₆₈₀₃	1:10.000 (WB) 1:200 (TEM)	Pineda Antikörper-Service, Berlin; Diese Arbeit, Wiegard <i>et al.</i> [183]
α -KaiB1	Kaninchen IgG, Primärer Antikörper gerichtet gegen das Peptid CIDVLKNPQLAEEDKILAT, das aus KaiB1 abgeleitet wurde	1:5.000 (WB)	Pineda Antikörper-Service, Berlin; Diese Arbeit,
α -KaiB2	Kaninchen IgG, Primärer Antikörper gerichtet gegen das Peptid ENLNALSGNQNLVWQLRC, das aus KaiB2 abgeleitet wurde	1:3.000 (WB)	Pineda Antikörper-Service, Berlin; Diese Arbeit
α -KaiB3	Kaninchen IgG, Primärer Antikörper gerichtet gegen das Peptid CLDIVPEGLQVRLPED, das aus KaiB3 abgeleitet wurde	1:4.000 (WB)	Pineda Antikörper-Service, Berlin; Diese Arbeit

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Hersteller
α -KaiC1	Kaninchen IgG, Primärer Antikörper gerichtet gegen das Peptid NLPIVNERNRPDVPRKGVQ, das aus KaiC1 abgeleitet wurde	1:3.750 (WB) 1:50 (TEM)	Pineda Antikörper-Service, Berlin; Diese Arbeit, Wiegard <i>et al.</i> [183]
α -KaiC2	Kaninchen IgG, Primärer Antikörper gerichtet gegen das Peptid CEAIKRRQQALESKRNFERRK, das aus KaiC2 abgeleitet wurde	1:2.500 (WB)	Pineda Antikörper-Service, Berlin; Diese Arbeit, Wiegard <i>et al.</i> [183]
α -KaiC3	Kaninchen IgG, Primärer Antikörper gerichtet gegen das Peptid CMYTAQSEVERLSGLFDEKI, das aus KaiB1 abgeleitet wurde	1:7.500 (WB) 1:100 (TEM)	Pineda Antikörper-Service, Berlin; Diese Arbeit, Wiegard <i>et al.</i> [183]
α -D1 (PsbA/D1 protein of PSII, C-terminal)	Kaninchen IgG, Primärer Antikörper gerichtet gegen ein synthetisches Peptid, das aus D1-Proteinsequenz verschiedener Organismen abgeleitet wurde	1:7.500 (WB)	Agrisera, Vännäs, Schweden
anti-IgG-Kaninchen-HRP-Konjugat	Ziege IgG, Sekundärer Antikörper gerichtet gegen invariable Ketten von Kaninchen IgG, konjugiert mit HRPeroxidase	1:50.000 (WB)	Thermo Scientific, Schwerte
anti-IgG-Kaninchen-Gold-Konjugat	Ziege IgG, Sekundärer Antikörper gerichtet gegen invariable Ketten von Kaninchen IgG, konjugiert mit 10 nm Goldpartikeln	1:50 (TEM)	Sigma, Dorset, England

4.1.8 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Reaktionskits werden nachfolgend aufgelistet. Restriktionsendonukleasen wurden ausschließlich von Thermo Scientific (St. Leon-Roth) bezogen und sind nicht einzeln benannt.

Tabelle 4-8. Enzyme und Reaktionskits

Enzym / Reaktionskit	Hersteller
Benzonase® Nuklease	Merck Millipore, Darmstadt
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Scientific, St. Leon Roth
DreamTaq DNA-Polymerase	Thermo Scientific, St. Leon Roth

Enzym / Reaktionskit	Hersteller
Lambda-Protein-Phosphatase	New England Biolabs, Schwalbach
Lysozym	Thermo Scientific, St. Leon Roth
Phusion High Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
PreScission®-Protease	GE Healthcare, München
Quick-Change® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
RNase A	AppliChem GmbH, Darmstadt
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific, St. Leon Roth

4.1.9 Molekulargewichtsmarker und Fertiggele

Folgende Größenstandards und Fertiggele wurden verwendet:

Tabelle 4-9. Molekulargewichtsmarker und Fertiggele

Proteinstandards	Hersteller
PageRulerPrestained Protein Ladder	Thermo Scientific, St. Leon Roth
SERVA Native Marker, Liquid Mix for BN/CN	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DNA-Standards	Hersteller
GeneRuler 100bp DNA Ladder	Thermo Scientific, St. Leon Roth
GenRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Scientific, St. Leon Roth
Fertiggele	Hersteller
SERVAGel™N 4-16 vertical native gels	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

4.1.10 Kommerzielle Kits

Die nachstehenden kommerziellen Kits kamen zum Einsatz:

Tabelle 4-10. Liste der genutzten kommerziellen Kits

Kit	Hersteller
Immobilon™ Western Kit	Merck Millipore, Darmstadt

Kit	Hersteller
Invisorb Gel Extraction Kit	Invitek, Berlin
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren

4.1.11 Chromatografie

Für chromatografische Verfahren wurden folgende Materialien verwendet

Tabelle 4-11. Materialien für die Chromatografie

Material	Hersteller
MonoQ 5/50-Säule	GE Healthcare, München
Protino Gluthatione Agarose 4B	Macherey-Nagel, Düren
Resource™Q-Säule	GE Healthcare, München
TLC PEI Celulose F-Platten	Merck Millipore, Darmstadt

4.1.12 Sonstige Materialien

Tabelle 4-12 führt weitere in dieser Arbeit verwendete Materialien auf.

Tabelle 4-12. Liste der sonstigen in dieser Arbeit verwendeten Materialien

Material	Hersteller
C-Chip, Neubauer improved, Zählkammer	Biochrom, Berlin
Glasperlen 0,1/0,25-0,5 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Hex 300 High Trans Nickel, Nickel-Netzträger	Agar Scientific, Stansted, England
LR white resin	Sigma, Dorset, England,
Midori Green	Nippon Genetics, Düren
Millex-GS Sterilfilter (0,22 µm Porengröße)	Merck Millipore, Darmstadt
Pall Filter	Renner, Dannstadt

Material	Hersteller
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Roche, Berlin
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Berlin
Quick Start™ Bradford 1x Dye	Bio-Rad, München
Röntgenfilme	GE Healthcare, München
Roti®-PVDF (0,45 µm Porengröße)	Carl Roth, Karlsruhe
Rotilabo®-Blottingpapiere, Dicke 1,0 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Steril-Filter (0,25 µm Porengröße)	Renner, Dannstadt
Supor®Membran-Filterscheibe (0,8 µm Porengröße)	Pall Life Science, Port Washington, USA
Thermo Restore plus western blot stripping buffer	Thermo Scientific, St. Leon-Roth
Vivaspin 500, 5000 MWCO, 10.000 MWCO, 50.000 MWCO	Sartorius, Göttingen

4.1.13 Medien, Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzungen von Medien, Puffern und Lösungen sind in den jeweiligen Abschnitten des Methodenteils beschrieben. Sofern nicht anders angegeben, wurden sie mit dH₂O angesetzt und bei Bedarf sterilfiltriert oder autoklaviert.

4.2 Methoden

4.2.1 Mikrobiologische und physiologische Methoden

4.2.1.1 Sterilisation

Die Sterilisation von Kulturmedien, Lösungen, Puffern und Arbeitsutensilien erfolgte durch Autoklavieren bzw. Filtration durch Membranen mit 0,22 µm Porengröße.

4.2.1.2 Kultivierung von *E. coli*

Flüssigkulturen: Im Rahmen von Klonierungsarbeiten wurde *E. coli* aerob unter Standardbedingungen [298] in einem modifizierten LB-Medium [299] bei 37 °C und 200 rpm

in einem Flachbettschüttler inkubiert. Zur Proteinexpression wurde das reichhaltigere Terrific-Broth-Medium [300] verwendet.

Anzucht auf Festmedium: Für Klonierungsarbeiten sowie die kurzfristige Lagerung wurde *E. coli* auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht (ü. N.) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die Medien sowie der LB-Agar wurden jeweils als Instant-Mischung von Carl Roth (Karlsruhe) erworben, nach Herstellerangaben gelöst und autoklaviert. Die Selektion plasmidhaltiger Bakterien erfolgte durch Zugabe geeigneter Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen: Ampicillin (Amp): 100 µg ml⁻¹, Kanamycin (Km): 20 µg ml⁻¹, Chloramphenicol (Cm): 25 µg ml⁻¹.

- Amp-Stammlösung: 100 mg ml⁻¹ in 50 % EtOH
- Km-Stammlösung: 20 mg ml⁻¹
- Cm-Stammlösung: 25 mg ml⁻¹ in 96 % EtOH

4.2.1.3 Kultivierung von *Synechocystis*

Flüssigkulturen: Die Anzucht von *Synechocystis* erfolgte photoautotroph oder mixotroph (unter Zugabe von 0,2 % Glucose) in *batch*-Kulturen. BG11-Medium [163] wurde mit etwas Zellmaterial von einer BG11-Agarplatte (s. u.) inokuliert und bei 30 °C entweder in Erlenmeyerkolben unter stetigem Schütteln bei ca. 125 rpm oder in speziellen Glasfermentatoren unter Begasung mit steriler Raumluft kultiviert. Dabei wurden die Kulturen kontinuierlich oder rhythmisch mit Weißlicht (Osram FL4OSS-W/37) mit 80 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ bestrahlt.

Flüssigkultivierung unter rhythmischer Belichtung. Für zeitaufgelöste Experimente wurden die Kulturen stets in Glasfermentatoren angezogen und, wenn nicht anders angegeben, für mindestens drei Tage in LD synchronisiert, bevor sie in unterschiedliche Belichtungsrythmen überführt wurden. Die Belichtungszyklen sind dem Haupttext zu entnehmen. Dabei steht L immer für zwölfstündige Belichtung und D für zwölfstündige Dunkelheit.

Anzucht auf Festmedium: Für die kurzfristige Lagerung und das Anwachsen nach Kryokonservierung (4.2.1.4.2) wurde *Synechocystis* auf BG11-Festmedium mit 0,75 % Agar

(Difco) ausgestrichen und bei 28 °C und kontinuierlicher Belichtung mit Weißlicht (Philips TLD F36W/33, 50-60 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kultiviert.

Die Selektion antibiotikaresistenter Mutanten erfolgte durch die Zugabe von 50-80 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin (Km) bzw. 14 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Chloramphenicol (Cm).

- BG11-Medium:
 - 1 % (v/v) 100 x BG11
 - 0,1 % (v/v) 1000 x Na_2CO_3
 - 0,1 % (v/v) 1000 x $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
 - 0,1 % (v/v) Spurenelemente
 - 10 mM TES-KOH, pH 8,0
 - 0,1 % (v/v) 1000 x Eisenammoniumcitrat (Zugabe nach dem Autoklavieren)
- 100x BG11:
 - 149,58 g l^{-1} NaNO_3
 - 7,49 g l^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 - 3,6 g l^{-1} $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
 - 0,6 g l^{-1} Zitronensäure
 - 0,25 M NaEDTA, pH 8,0
- 1000 x Na_2CO_3 : 20 mg ml^{-1}
- 1000 x $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$: 30 mg ml^{-1}
- Spurenelemente:
 - 2,86 g l^{-1} H_3BO_3
 - 1,81 g l^{-1} $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
 - 0,222 g l^{-1} $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 - 0,390 g l^{-1} mM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 0,079 g l^{-1} mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
 - 0,049 g l^{-1} mM $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- 1000 x Eisenammoniumcitrat: 6 mg ml^{-1}
- Km-Stammlösung: 40 mg ml^{-1}
- Cm-Stammlösung: 7 mg ml^{-1} n 96 % EtOH

4.2.1.4 Herstellung von Dauerkulturen

4.2.1.4.1 *E. coli*

Zur Langzeitkonservierung von *E. coli* wurden 3 ml LB-Medium mit geeigneten Antibiotika (siehe 4.2.1.2) in einem Kulturröhrchen mit einer Bakterienkolonie inokuliert und ü. N. bei 37 °C und 200 rpm in einem Flachbettschüttler inkubiert. Anschließend wurden 700 μl der

Übernachtskultur mit 300 µl 50 % Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

4.2.1.4.2 *Synechocystis*

Zur längeren Lagerung von *Synechocystis* wurde etwas Zellmaterial steril von einer BG11-Agarplatte entnommen, in 1 ml Kryomedium resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

- Kryomedium: 0,5x BG11, 8 % (v/v) DMSO
- 0,5x BG11:
 - 0,5 % (v/v) 100 x BG11 (siehe 4.2.1.3)
 - 0,05 % (v/v) 1000 x Na₂CO₃ (siehe 4.2.1.3)
 - 0,05 % (v/v) 1000 x K₂HPO₄ (siehe 4.2.1.3)
 - 0,1 % (v/v) Spurenelemente (siehe 4.2.1.3)
 - 5 mM TES-KOH, pH 8,0 (siehe 4.2.1.3)
 - 0,05 % (v/v) 1000 x Eisenammoniumcitrat (siehe 4.2.1.3)

4.2.1.5 Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen

4.2.1.5.1 *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde anhand der Streuung bei 600 nm geschätzt. Die Messung erfolgte in einem Spektralphotometer (Novaspec III Visible Spectrophotometer, GE Healthcare, München) in Plastikküvetten gegen das entsprechende Medium als Leerwert.

4.2.1.5.2 *Synechocystis*

Zur Bestimmung der Zelldichte von *Synechocystis* wurde die Streuung bei 750 nm gegen BG11-Medium (4.2.1.3) in einem Spektralphotometer (Specord200 Plus, Analytik Jena, Jena) in Plastikküvetten gemessen. In 39 unabhängigen Bestimmungen wurden parallel die Zellen pro Milliliter Wildtyp-Kultur in einer Zählkammer (C-Chip, Neubauer improved, Biochrom, Berlin) gezählt und aufgrund dessen für Wildtyp und Mutanten angenommen, dass eine Kultur mit OD_{750nm} von 1 pro Milliliter $7,85 \pm 1,97 \times 10^{-7}$ Zellen enthält.

4.2.1.6 Bestimmung der Verdopplungszeit von *Synechocystis*

Zur Bestimmung der Verdopplungszeit der *Synechocystis*-Population während der Zeitserienexperimente wurde vereinfacht angenommen, dass ein exponentielles Wachstum vorlag. Für jedes biologische Replikat wurde zunächst für alle Zeitintervalle (Δt) die mittlere Wachstumsrate (μ) von *Synechocystis* anhand der OD_{750nm} zu den entsprechenden Zeitpunkten (t_1 und t_2) berechnet:

$$\mu = \frac{\Delta OD_{750nm}}{\Delta t(h)} = \frac{OD_{750nm}2 - OD_{750nm}1}{t_2(h) - t_1(h)}$$

$$\text{z. B.} \quad \mu = \frac{0,64 - 0,52}{9,5 \text{ h} - 5,5 \text{ h}} = 0,03 \text{ h}^{-1}$$

Die mittleren Wachstumsraten wurden jeweils gegen die OD_{750nm} zum Zeitpunkt t_2 aufgetragen und anhand der Steigung einer Regressionsgeraden der Mittelwert aller mittleren Wachstumsraten für das biologische Replikat ermittelt.

Aus dem Mittelwert der Wachstumsraten aller biologischen Replikate konnte die mittlere Verdopplungszeit (t_d) der *Synechocystis*-Population berechnet werden.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

$$\text{z. B.} \quad t_d = \frac{\ln 2}{0,00875} = 80 \text{ h}^{-1}$$

4.2.1.7 Absorptionsspektren ganzer Zellen von *Synechocystis*

Zur phänotypischen Charakterisierung der Cyanobakterien-Kulturen wurden Absorptionsspektren ganzer *Synechocystis*-Zellen in Flüssigkultur bei RT im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 750 nm in einem Spektralphotometer (Specord200 Plus, Analytik Jena, Jena) in Plastikkuvetten gemessen. Der Nullabgleich erfolgte gegen BG11. Vor den Messungen wurde eine Basislinie mit leeren Kuvetten aufgenommen.

Um das Phycocyanin zu Chlorophyll a-Verhältnis zu veranschaulichen, wurden die Spektren zunächst auf die OD_{750nm} normiert. Dazu wurde die OD_{750nm} von den ODs bei allen gemessenen Wellenlängen subtrahiert. Anschließend wurde das Absorptionsmaximum des Chlorophyll a bei

ca. 680 nm ermittelt und die Absorptionsspektren auf eine OD von 1 bei der entsprechenden Wellenlänge (OD_{680nm*}) normiert.

$$\text{z. B. } \frac{OD_{400nm}}{OD_{680nm*}}$$

4.2.1.8 Bestimmung des Phycocyanin/Chlorophyll a-Verhältnisses nach Myers

Anhand der auf die OD_{750nm} normierten Absorptionsspektren ganzer Zellen (4.2.1.7) wurde das Verhältnis von Phycocyanin (PC) zu Chlorophyll a (Chl) in *Synechocystis*-Flüssigkulturen berechnet. Es wurden die Absorptionsmaxima von Phycocyanin bei ca. 625 nm und Chlorophyll a bei ca. 680 nm ermittelt und die entsprechenden ODs (OD_{625nm*} bzw. OD_{680nm*}) in folgende Formel nach Myers et al. [211] eingesetzt:

$$\frac{PC}{Chl} = \frac{1,0162 \times OD_{625nm*} - 0,2612 \times OD_{680nm*}}{1,0162 \times OD_{680nm*} - 0,063 \times OD_{625nm*}}$$

4.2.1.9 Chlorophyllbestimmung nach Houmard and de Marsac

Die Bestimmung des Chlorophyll-Gehalts in Flüssigkultur erfolgte nach Extraktion mit 90 % (v/v) Methanol [301]. Zellen aus 1 ml Flüssigkultur wurden für 5 min bei 15.000 g und 4 °C sedimentiert und 900 µl des Überstandes verworfen. Die pelletierten Zellen wurden in den verbleibenden 100 µl Überstand resuspendiert und mit 900 µl versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln und zehnminütiger Zentrifugation bei 15.000 g wurde die Extinktion des Überstands bei 665 nm gegen 90 % (v/v) Methanol gemessen und der Chlorophyll a Gehalt berechnet:

$$Chl\ a\ (\mu g\ \mu l^{-1}) = OD_{665\ nm} \times 13,9\ \mu g\ \mu l^{-1}$$

4.2.1.10 Lichtmikroskopie

Mithilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss Axiolab, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) wurden cyanobakterielle Flüssigkulturen bei 40-facher Vergrößerung auf Kontaminationen überprüft, und Zellzählungen durchgeführt (4.2.1.5.2). Dabei wurde das Phasenkontrastverfahren angewendet.

4.2.1.11 Präparation chemisch kompetenter *E. coli* –Zellen nach Inoue *et al.*

Die Herstellung ultrakompetenter *E. coli* –Zellen erfolgte mit der Manganchloridmethode nach Inoue *et al.* [302]. Zunächst wurden 3 ml LB-Medium mit 20 mM Glucose (LB_{Gluc}) mit einer Bakterienkultur inokuliert und über Tag bei 37 °C und 200 rpm im Flachbettschüttler inkubiert. Aus der Übertagkultur wurde eine zweite Vorkultur zweiprozentig in LB_{Gluc} beimpft, ü. N. bei 200 rpm und RT kultiviert und am nächsten Tag LB_{Gluc} fünfprozentig damit inokuliert. Die Bakteriensuspension wurde bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 bei RT und 200 rpm kultiviert und anschließend für 20 min auf Eis gekühlt. Nach der schonenden Sedimentation der Zellen bei 2.700 g und 4 °C für 10 min wurden diese in eiskaltem Transformationspuffer (TB) (1/4 Volumen des Ausgangskulturvolumens) aufgenommen, erneut sedimentiert und in 1/10 Volumen TB (bezogen auf die Ausgangskultur) resuspendiert. Nach Zugabe von 7 % DMSO erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Gebrauchsfertige Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Die Kompetenz wurde durch Transformation (4.2.2.9) mit 100 pg pUC19 überprüft. Zellen mit einer Transformationseffizienz von weniger als $1 \cdot 10^5 \mu\text{g}^{-1}$ DNA wurden verworfen.

- TB:
 - 10 mM PIPES
 - 55 mM MnCl₂
 - 15 mM CaCl₂
 - 250 mM KCl; pH 7,6
- Glucose-Stammlösung: 2 M Glucose

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1 Isolation genomischer DNA aus *Synechocystis*

Zur Isolation genomischer DNA wurden 10-20 ml Kultur mit einer OD_{750nm} unter 1 durch zehnminütige Zentrifugation bei 1.500 g und 4 °C geerntet oder auf einer Supor®Membran-Filterscheibe (0,8 µm Porengröße, Pall Life Science, Port Washington, USA) gesammelt. Die durch Zentrifugation sedimentierten Zellen wurden mit 1/20 Kulturvolumen TES gewaschen und erneut pelletiert. Bei Verwendung von Filtern wurde mit 10 ml TES gespült und die Filter mit den daran haftenden Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert. Anschließend wurden die Zellen durch 20-30-minütiges

Schwenken bei 37 °C in 500 µl TES mit 2 µg µl⁻¹ Lysozym aufgeschlossen. Zur Extraktion der genomischen DNA folgte eine 15-minütige Inkubation mit einem Volumen PCI-Mix und 1 % N-Laurylsarcosin. Anschließend wurde die wässrige (nukleinsäurehaltige) Phase durch Zentrifugation für 10 min bei 19.000 g und 4 °C von der organischen und Interphase separiert, abgenommen und darin enthaltene RNA durch 15-minütige Inkubation mit 100 ng µl⁻¹ RNase A bei 37 °C degradiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens CI, 0,7 M NaCl und 1,5 % CTAB sowie fünfminütigem Schwenken wurden verbliebene Phenolreste durch Zentrifugation (5 min, 19.000 g, 4 °C) entfernt. Der wässrige Überstand wurde mit 1 Volumen CI für 10 min bei RT geschwenkt und erneut für 5 min bei 19.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die DNA im wässrigen Überstand wurde mit einem Volumen 2-Propanol bei -20 °C gefällt, durch Zentrifugation sedimentiert und anschließend zweimal mit 1 ml eiskaltem 70-prozentigem Ethanol gewaschen. Die Zentrifugationen erfolgten dabei für 10 min bei 19.000 g und RT. Die pelletierte DNA wurde an der Luft getrocknet und in 100 µl TE aufgenommen. Die Resuspension der genomischen DNA in TE wurde hierbei durch Inkubation bei RT für mindestens 30 min gefördert. Anschließend wurde die DNA im Kühlschrank oder bei -20 °C gelagert.

- TES: 5 mM Tris-HCl, pH 8,0
5 mM EDTA, pH 8,0
50 mM NaCl
- TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
0,1 mM EDTA
- CTAB-Stammlösung: 10 % (w/v) in 0,7M NaCl
- N-Laurylsarcosin-Stammlösung: 10 % (w/v) in TES
- RNase A: 10 g/l in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
50 % (v/v) Glycerin
- PCI: Phenol, Chloroform, 3-Methyl-1-Butanol (25:24:1 v/v/v)
- CI: Chloroform, 3-Methyl-1-Butanol (24:1 v/v)

4.2.2.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mithilfe des *NucleoSpin® Plasmid Kits* (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben oder durch Alkalische Lyse.

Zur alkalischen Lyse wurden 3 ml ÜNK bei 3.800 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und die sedimentierten Zellen in 100 µl eiskalter Lösung I aufgenommen. Das Solubilisat wurde vorsichtig mit 200 µl Lösung II und anschließend mit 150 µl eiskalter Lösung III gemischt. Es folgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 16.000 g und RT, nach der der Überstand abgenommen wurde. Anschließend wurde die DNA mit 1 ml Ethanol gefällt, bei 16.000 g und RT für 5 min sedimentiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Sedimentation wurde die Plasmid-DNA an der Luft getrocknet und in 50 µl TE mit 10 ng µl⁻¹ RNase A gelöst.

- Lösung I: 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
50 mM Glucose
- Lösung II: 200 mM NaOH
1 % SDS
- Lösung III: 3 M Kaliumacetat
11,5 % Eisessig
- TE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0
1 mM EDTA

4.2.2.3 DNA-Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Mullis *et al.*

Die PCR nach Mullis *et al.* [303] diente zur *in vitro* Amplifikation definierter DNA-Sequenzen aus dem cyanobakteriellen Genom. Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, die für spätere Klonierungsarbeiten verwendet werden sollten, wurde die Phusion High Fidelity DNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) aufgrund ihrer hohen Fehlerkorrekturrate verwendet. Bei Kolonie-PCRs wurde die kostengünstigere Polymerase Dreamtaq (Thermo Scientific, St. Leon-Roth) eingesetzt. Präparative PCRs wurden in 50 µl Ansätzen mit genomischer DNA als Matrize durchgeführt. Bei Kolonie-PCRs diente unaufgeschlossenes Zellmaterial als Matrize. Hier wurde das Reaktionsvolumen auf 10 µl reduziert. Die Zusammensetzung und Temperaturzyklen wurden aufgrund der Herstellerangaben unter Berücksichtigung der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer gewählt. Die Berechnung der Schmelztemperaturen erfolgte nach der *Nearest Neighbour* Methode mit dem *Onlinetool Oligo Calc* [304].

Die PCR-Produkte wurden durch elektrophoretische Auftrennung analysiert (4.2.2.5) oder für Klonierungsarbeiten gereinigt (4.2.2.4).

4.2.2.4 Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden entweder direkt mithilfe des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits* (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers gereinigt oder elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und aus diesem eluiert (siehe 4.2.2.5).

4.2.2.5 Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion

DNA-Fragmente wurden in 0,7 - 1,5 % Agarosegelen mit 0,04 µl ml⁻¹ Midori Green (Nippon Genetics, Düren) separiert. Vor dem Lauf wurden die Proben mit 1 x Ladepuffer versetzt. Analytische Auftrennungen erfolgten in 0,5 x Tris-Borat-EDTA(TBE)-Puffer bei 3-5 V pro cm Elektrodenabstand. Bei präparativen Auftrennungen mit anschließender Elution von DNA-Fragmenten wurde 1 x Tris-Acetat-EDTA(TAE)-Puffer verwendet, um Interaktionen des Borats mit dem Säulenmaterial bei der Elution zu verhindern. Dabei wurde eine Spannung von 2 V pro cm Elektrodenabstand angelegt.

Die DNA-Fragmente wurden unter Blaulicht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mithilfe des *Invisorb Gel Extraction Kits* (Invitek, Berlin) oder *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits* (Macherey-Nagel, Düren) nach Angabe des Herstellers eluiert.

- 10 x TAE: Rotiphorese® 10x TAE-Puffer (Carl Roth, Karlsruhe)
0,4 M Tris-HCl
0,2 M Essigsäure
10 mM EDTA; pH 8,3
- 10 x TBE: Rotiphorese® 10x TBE-Puffer (Carl Roth, Karlsruhe)
1 M Tris-Borat
20 mM EDTA, pH 8,3
- 6 x Ladepuffer: 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific, Schwerte)
10 mM Tris-HCl (pH 7,6)
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylen Cyanol FF
30 % (v/v) Glycerin

4.2.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration und –Reinheit

Genomische DNA wurde an einem UV-Vis-Spektralphotometer (Specord 200 Plus, Analytik Jena, Jena) in reduzierten Quarzglas-Küvetten mit 1 cm Schichtdicke bei 260 nm und 280 nm

vermessen. Dazu wurden die Proben zunächst für mehrere Stunden bei RT inkubiert, um die Homogenität der DNA-Lösung zu steigern. Anschließend wurde die DNA 1:10 in TE-Puffer (4.2.2.1), welcher bei der Messung auch als Leerwert diente, verdünnt. Anhand der Absorption bei 260 nm sowie des für doppelsträngige DNA gültigen Extinktionskoeffizienten von $50 \text{ ng cm}^{-1} \mu\text{l}^{-1}$ wurde die DNA-Konzentration berechnet.

$$c[\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}] = \frac{OD_{260 \text{ nm}} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000}$$

Zudem wurde die Qualität der Nukleinsäure anhand des Absorptionsverhältnisses $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$ ermittelt. Präparationen mit einem Verhältnis $< 1,3$ wurden nicht verwendet.

Die Konzentration und Reinheit von Plasmid-DNA sowie von DNA-Fragmenten wurden spektrophotometrisch am NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Karlsruhe) bestimmt. Dazu wurden jeweils 1,5 μl Probe gegen den zur DNA-Solubilisation verwendeten Puffer als Referenz gemessen. Die Berechnung der Konzentration sowie des Reinheitsfaktors erfolgte dabei von der Gerätesoftware analog zu den obigen Angaben.

4.2.2.6.1 Berechnung der Chromosomen-Kopienzahl nach Griese *et al.* [169][169][169]

Anhand der aus einem definierten Kulturvolumen mit bekannter Zellzahl isolierten Menge genomischer DNA konnte die Chromosomen-Kopienzahl in *Synechocystis* abgeschätzt werden.

Hierzu wurde zunächst anhand der DNA-Konzentration (4.2.2.6) unter der vereinfachten Annahme einer verlustfreien Isolation die DNA-Masse pro Zelle (m_{isoliert}) berechnet. In Anlehnung an Griese und Kollegen [169] erfolgte die Berechnung der Kopienzahl des Chromosoms anschließend unter Berücksichtigung der durchschnittlichen molaren Masse einer DNA-Base ($M_B = 660 \text{ g mol}^{-1}$), der Avogadro-Konstante ($N_A = 6,02214129 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) sowie der Genomgröße ($G = 3,57 \text{ Mbp}$):

$$\text{Kopienzahl} = \frac{M_{\text{Genom}}}{M_{\text{isoliert}}} = \frac{G \times M_B}{m_{\text{isoliert}} \times N_A}$$

Dies sei exemplarisch für 21 fg isolierte DNA pro Zelle dargestellt:

$$\text{Kopienzahl} = \frac{3,57 \times 10^6 \text{ Basen} \times 660 \text{ g mol}^{-1}}{21 \times 10^{-15} \text{ g} \times 6,02214129 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}} = 5,4$$

4.2.2.7 DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen

Für analytische oder präparative Zwecke im Rahmen von Klonierungsarbeiten wurden DNA-Spaltungen mit spezifischen Restriktionsendonukleasen (Thermo Scientific, St Leon-Rot) durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten nach Angaben des Herstellers und in den vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffern. Dabei wurden meist 5 U Restriktionsendonuklease pro Mikrogramm DNA eingesetzt.

4.2.2.8 Ligation von DNA-Molekülen

Für eine Ligation über komplementäre Enden wurden der jeweilige Vektor und ein Schnittstellen tragendes PCR-Fragment zunächst mit denselben Restriktionsendonukleasen geschnitten (4.2.2.7). Anschließend wurden bis zu 50 ng linearisiertes Plasmid in einem molaren Verhältnis von 1:5 (Plasmid:DNA) mit 1 x T4 DNA Ligase-Puffer (Thermo Scientific, St Leon-Rot) und 0,05 U μl^{-1} T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific, St Leon-Rot) für wenige Stunden bei RT inkubiert.

Bei der *blunt end* Klonierung unter Verwendung des *CloneJET PCR Cloning Kits* (Thermo Scientific, St Leon-Rot) wurde nach Herstellerangaben verfahren.

4.2.2.9 Transformation von *E. coli* nach Hanahan

E. coli Zellen wurden nach der Hitzeschockmethode nach Hanahan [305] transformiert. Dazu wurde ein definiertes Volumen chemisch kompetenter Zellen unter ständiger Eiskühlung aufgetaut und für 30 min mit maximal 1/10 Volumen eines Ligationsansatzes bzw. 0,05-1 μg Plasmid-DNA auf Eis inkubiert. Nach einem einminütigen Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad wurden die Zellen für 5 min auf Eis gekühlt, mit LB- oder SOC-Medium auf 1 ml aufgefüllt und darin für 1 h bei 37 °C und 200 rpm regeneriert. 1/10 des Volumens wurde auf LB-Platten mit geeigneten Restriktionsmarkern appliziert. Die restlichen Zellen wurden 3 min bei 1.000 g sedimentiert, in 100 μl Restmedium aufgenommen und ebenfalls ausplattiert. Resultierende Transformanten wurden ü.N. bei 37 °C inkubiert und mittels Kolonie-PCR (4.2.2.3) sowie durch Restriktion isolierter Plasmid-DNA (4.2.2.7 und 4.2.2.2) charakterisiert.

LB-Medium wurde als Instant-Mischung von Carl Roth (Karlsruhe) bezogen und nach Herstellerangaben gelöst und autoklaviert. SOB-Medium wurde als Fertigmedium von New England Biolabs (Frankfurt am Main) verwendet.

4.2.2.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden der Firma *Services in Molecular Biology* (Berlin) in Auftrag gegeben. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Computerprogramm *Chromas lite* (Version 2.01).

4.2.2.11 Konstruktion der Plasmide zur heterologen Expression GST-fusionierter Kai-Proteine

Zur N-terminalen Fusion der Kai-Proteine aus *Synechocystis* mit einem GST-tag wurden die kodierenden Gene *kaiA*₆₈₀₃, *kaiB1*, *kaiC1*, *kaiB3* und *kaiC3* (ORF *slr0756*, *slr0757*, *slr0758*, *slr0486* und *slr1942*,) unter Verwendung der Primer 1-10 (Tabelle 4-5) aus genomischer DNA amplifiziert (4.2.2.3). Dabei wurden Primer-vermittelt die Schnittstellen BamHI und NotI am 5'- bzw. 3'-Ende eingefügt. Nach einer Reinigung (4.2.2.4) wurden die amplifizierten Fragmente und pGEX-kaiB₇₉₄₂ mit BamHI und NotI geschnitten (4.2.2.7), erneut gereinigt (4.2.2.5) und ligiert (4.2.2.8). Dadurch wurden die Plasmide pGEX-kaiA, pGEX-kaiB1, pGEX-kaiC1, pGEX-kaiB3 und pGEX-kaiC3 generiert, welche durch Sequenzierung mit den Primern 11, 12 und 13 (im Falle von pGEX-kaiC1) überprüft wurden (4.2.2.10).

4.2.2.12 Konstruktion des Plasmids pCOLD-kaiC1

Um zu testen, ob die Expression von KaiC1 als His-Fusionsprotein bei niedrigen Temperaturen zu einer besseren Proteinausbeute führt, wurde der ORF *slr0756* mit den Primern 14 und 15 (Tabelle 4-5) unter Verwendung von genomischer *Synechocystis* DNA amplifiziert (4.2.2.3). Anschließend wurde das PCR-Produkt mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und AvrII und der Vektor pCOLDI (Takara Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) mit NdeI und XbaI restringiert (4.2.2.7). Durch Ligation wurde der Vektor pCOLD-I-kaiC1 generiert und durch Sequenzierung mit den Primern 16 und 17 (Tabelle 4-5) überprüft (4.2.2.10).

4.2.2.13 Konstruktion des Plasmids pTYB2-kaiC1

Zur Expression von KaiC1 mit dem selbst-schneidenden Intein-tag wurde der ORF *slr0756* aus genomischer DNA amplifiziert (Primer 14 und 18, Tabelle 4-5) (4.2.2.3) und in den Vektor (pJET CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific, St Leon-Rot) ligiert. Nach Restriktion mit NdeI und XhoI (4.2.2.7) erfolgte die Ligation in die *multiple cloning site* des entsprechend restringierten Vektors pTYB2 (New England Biolabs, Frankfurt am Main) (4.2.2.8). Zur Überprüfung des Konstrukts erfolgte eine Sequenzierung mit den Primern 13, 19 und 20 (Tabelle 4-5, 4.2.2.10).

4.2.2.14 Konstruktion des Plasmids pCOLA-kaiC1 und pACYC-kaiC1

Um zu überprüfen ob die Verwendung von Vektoren, die in nur mittlerer Kopienzahl in der Zelle vorliegen die Expression löslichen KaiC erhöht wurde das kodierende Gen (ORF *slr0756*) unter Verwendung genomischer DNA sowie der Primer 15 und 21 (Tabelle 4-5) amplifiziert (4.2.2.3). Das PCR-Produkt wurde mit BamHI und AvrII restringiert (4.2.2.7) und in die analog behandelten Vektoren pCOLA-Duet und pACYC-Duet (beide Merck Millipore, Darmstadt) ligiert (4.2.2.8). Zur Überprüfung der Plasmide durch Sequenzierung dienten die Primer 19 und 22 (Tabelle 4-5, 4.2.2.10).

4.2.2.15 Ortsgerichtete Mutagenese von pGEX-kaiC3 zur Expression von KaiC3-AA und KaiC3-DE

Zur Expression von KaiC3-Varianten wurde pGEX-kaiC3 durch ortsgerechte Mutagenese nach Wang und Malcom [306] modifiziert. Dabei wurden die für S423 und T424 kodierenden Basentriplets in *kaiC3* derart ausgetauscht, dass sie für zwei Alaninreste (KaiC3-AA) bzw. Glutamat und Aspartat (KaiC3-DE) kodieren. Die einzelnen Schritte wurden von Nancy Sauer im Rahmen ihrer Bachelorarbeit unter Verwendung des Quick-Change® Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene, Heidelberg) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.2.3 Biochemische Methoden

4.2.3.1 Zellernte

4.2.3.1.1 *E. coli*

E. coli Zellen wurden bei 4.000 g und 4 °C für 10 min pelletiert und der Überstand abgenommen. Falls erforderlich, wurden die sedimentierten Zellen bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.2.3.1.2 *Synechocystis*

Die Sedimentation von Cyanobakterien erfolgte bei 1.500 g und 4 °C für jeweils 10 min. War eine Lagerung erwünscht wurden die Zellen entweder direkt oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -20 °C eingefroren.

4.2.3.2 Aufschluss von *E. coli*-Zellen

4.2.3.2.1 Aufschluss durch alkalische Lyse

Für Expressionsanalysen in kleinem Maßstab wurden *E. coli*-Zellen durch Enzymatische Lyse aufgeschlossen. Dazu wurden Zellen aus 1 ml *E. coli*-Kultur geerntet, in 100 µl Lysispuffer aufgenommen und 30 min bei 37 °C inkubiert.

- Lysispuffer:
 - 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
 - 150 mM NaCl
 - 0,5 mM EDTA
 - 1 mM DTT
 - 0,2 µg µl⁻¹ Lysozym
 - 0,005 U µl⁻¹ Benzonase® Nuklease
 - 5 mM MgCl₂ (bei Expression der KaiC-Proteine)
 - 1 mM ATP (bei Expression der KaiC-Proteine)

4.2.3.2.2 Aufschluss mittels Kavitation

Größere Zellmengen wurden einem Aufschluss mittels Kavitation unterzogen. Die pelletierten Zellen (4.2.3.1.1) wurden dazu zunächst in ca 10 ml Extraktionspuffer aufgenommen und für 30 min mit 17.000 U Lysozym (Applichem, Darmstadt) sowie 125 U Benzonase® Nuklease (Merck Millipore, Darmstadt) auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie unter ständiger

Eiskühlung für 6 min mit 60 % Leistung beschallt (Bandelin SONOPULS HD2200, KE 76 Sonotrode, Puls-Stufe 3). Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 23.000 g zur Trennung des löslichen Extrakts von Membranbestandteilen und nicht aufgeschlossenen Zellen.

- Extraktionspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
0,5 mM EDTA
1 mM DTT
5 mM MgCl₂ (bei Reinigung der KaiC-Proteine)
1 mM ATP (bei Reinigung der KaiC-Proteine)

4.2.3.3 Aufschluss von *Synechocystis*-Zellen

Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten wurden sedimentierten Zellen (4.2.3.1.2) in ca. 20 µl Thylakoidpuffer pro ml Ausgang-Kulturvolumen aufgenommen und mit einem Volumen Glasperlen (0.1 mm and 0.25-0.5 mm, 1:1 gemischt) versetzt. Die Suspension wurde in einer Zelmühle (Retsch, Haan) bei 4 °C und 30 Hz für 10 min geschüttelt und anschließend bei 4 °C und 1.500 g zentrifugiert. Der Gesamtzellextrakt wurde abgenommen, verbliebene nicht aufgeschlossene Zellen einem weiteren Aufschlussschritt unterzogen und der resultierende Gesamtzellextrakt mit dem vorherigen vereinigt.

- Thylakoidpuffer: 50 mM Hepes-NaOH, pH 7.5
5 mM MgCl₂
25 mM CaCl₂
50 mM EDTA, pH 8
10% (v/v) Glycerol
1 Tablette 10 ml⁻¹ Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (Roche, Berlin)
1 Tablette 10 ml⁻¹ Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Berlin)

War eine Dephosphorylierung durch Lambda-Proteinphosphatase (4.2.3.15.3) vorgesehen, wurde Thylakoidpuffer ohne Phosphatase-Inhibitor-Cocktail verwendet.

4.2.3.4 Fraktionierung von löslichen und membranständigen Proteinen

Membranbestandteile und lösliche Proteine wurden durch mindestens 30-minütige Zentrifugation bei 23.000 g und 4 °C separiert. Der Überstand mit den cytosolischen Proteinen wurde stets ein weiteres Mal zentrifugiert, um restliche Membranbestandteile zu entfernen. Die Membranfraktion wurde - wie im Text angegeben - ein- der mehrfach gewaschen. Dazu wurde das Membranpellet in einem 6,25-fachen Volumen Thylakoidpuffer aufgenommen, erneut bei

23.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dem Thylakoidpuffer wurde dabei z. T. NaCl bis zu einer Endkonzentration von 2 M zugesetzt. Abschließend erfolgte die Resuspension des Membranpellets in einem zum Ausgangs-Gesamtzellextrakt äquivalenten Volumen Thylakoidpuffer und eine vergleichende Analyse mit den löslichen Proteinen durch Westernblotting (4.2.3.12).

4.2.3.5 Heterologe Expression von Proteinen in *E.coli*

Zur Expression der GST-Kai-Proteine wurde ein definiertes Volumen TB-Medium [307] mit 100 µg ml⁻¹ Ampicillin zehnprozentig mit einer ÜNK inokuliert. Die Expression von GST-KaiA₇₉₄₂, GST-KaiA₆₈₀₃, GST-KaiB₇₉₄₂, GST-KaiB1, GST-KaiB2, GST-KaiB3 und GST-KaiB_{MED4} wurde nach dreistündiger Kultivierung bei 37 °C und 200 rpm durch 1 mM IPTG induziert und die Zellen üN bei 37 °C kultiviert. Die Expression von GST-KaiC₇₉₄₂, GST-KaiC1 und GST-KaiC3 erfolgte ohne Induktion für ca. 72 h bei 37 °C.

TB-Medium wurde als Instant-Mischung von Carl Roth (Karlsruhe) bezogen und nach Herstellerangaben gelöst und autoklaviert.

Zur Produktion alternativer KaiC1-Fusionsproteine wurden Expressionsbedingungen in Anlehnung an die Herstellerempfehlungen der genutzten Expressionsplasmide getestet (4.2.2.12-4.2.2.14).

4.2.3.6 Reinigung GST-fusionierter Proteine mittels Glutathion-Affinitätschromatografie

Zur Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus einer Proteinlösung diente eine Glutathion-Affinitätschromatografie im *batch*-Verfahren. Alle im Folgenden aufgeführten Zentrifugationsschritte erfolgten für 4 min bei 1.500 g und 4 °C.

Vorbereitend wurde ein definiertes Volumen Glutathion-Matrix (Protino Glutathione Agarose 4B, Macherey-Nagel, Düren) einmal mit dem zehnfachen Volumen Extraktionspuffer gewaschen. Zur Bindung der rekombinanten Proteine an die Matrix wurde der lösliche Extrakt (4.2.3.5) 1 h bei RT mit der gewaschenen Matrix (0,5 ml pro Liter Expressionskultur) unter stetigem Schwenken inkubiert. Die Matrix wurde durch Zentrifugation sedimentiert und nicht-gebundene Proteine durch viermaliges Waschen mit je 45 Volumen Extraktionspuffer entfernt.

Anschließend wurde die Matrix mit PreScission-Puffer in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Inkubation mit PreScission ($0,1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ Matrix) in einem Matrixvolumen PreScission-Puffer bei 4°C und ü. N., um einen definierten Bereich zwischen GST-*tag* und dem mit ihm fusionierten Protein (3C-Proteaseschnittstelle) zu spalten. Der Überstand mit dem gewünschten Protein wurde abgenommen, die Matrix dreimal mit $500 \mu\text{l}$ PreScission- oder Reaktionspuffer (4.2.3.15) gespült und die eluierten Proteine anschließend in einem Zentrifugalkonzentrator (Vivaspin 500, Sartorius, Göttingen) konzentriert und in den gewünschten Puffer überführt.

Zur Überprüfung der Reinheit diente eine SDS-PAGE (4.2.3.9). War die Homogenität der Proteinpräparation nicht zufriedenstellend, erfolgte eine weitere Reinigung durch Anionenaustauschchromatografie (4.2.3.7)

- Extraktionspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
0,5 mM EDTA
1 mM DTT
5 mM MgCl₂ (bei Reinigung der KaiC-Proteine)
1 mM ATP (bei Reinigung der KaiC-Proteine)
- PreScissionpuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM DTT
5 mM MgCl₂ (bei Reinigung der KaiC-Proteine)
1 mM ATP (bei Reinigung der KaiC-Proteine)

4.2.3.7 Reinigung von Proteinen durch Anionenaustauschchromatografie

Kai-Proteine mit nicht zufriedenstellender Homogenität wurden in 10 ml Elutionspuffer A aufgenommen und mit einer Flussrate von $0,25\text{--}1 \text{ ml min}^{-1}$ auf eine in demselben Puffer äquilibrierte MonoQ 5/50 GL oder ResourceTMQ Säule (beide GE Healthcare, München) aufgetragen. Die Proteine wurden durch einen 0-1 M NaCl-Gradienten eluiert. Dazu wurde über 20 Säulenvolumen die Konzentration des Elutionspuffers A von 100 % auf 0 % gesenkt, während die Konzentration des Elutionspuffers B entsprechend auf 100 % gesteigert wurde. Die Proteinelution wurde über die Absorption bei 220 nm und 280 nm verfolgt und proteinhaltige Fraktionen in Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin 500, Sartorius, Göttingen) gegen Reaktionspuffer (4.2.3.6) dialysiert und konzentriert. Abschließend erfolgte eine Kontrolle der Homogenität der Proteinpräparation durch SDS-PAGE (4.2.3.9).

- Elutionspuffer A: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA
1 mM DTT
5 mM MgCl₂ (bei Reinigung der KaiC-Proteine)
0,5 mM ATP (bei Reinigung der KaiC-Proteine)
- Elutionspuffer B: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 M NaCl
1 mM EDTA
1 mM DTT
5 mM MgCl₂ (bei Reinigung der KaiC-Proteine)
1 mM ATP (bei Reinigung der KaiC-Proteine)

4.2.3.8 Proteinbestimmung

4.2.3.8.1 Konzentration von Proteinen

4.2.3.8.1.1 DOC/TCA-Fällung von Proteinen nach Bensadoun und Weinstein [308]

Zur exakten Proteinbestimmung nach Lowry (4.2.3.8.1.1) wurden proteinhaltige Lösungen und Zellextrakte mittels DOC/TCA-Fällung konzentriert, um störende Zellbestandteile bzw. Puffersubstanzen zu entfernen. Zu diesem Zwecke wurde ein definiertes Volumen der Lösung mit dH₂O auf 1 ml aufgefüllt, mit 25 µl 2 % (w/v) DOC gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 30 µl 40 % (v/v) TCA und erneutem Mischen wurden die gefällten Proteine pelletiert (bei 19.100 g und 4 °C für 10 min) und der Überstand verworfen. Für eine anschließende Konzentrationsbestimmung wurden die Proteine für mindestens 30 min in 100 µl 1M NaOH bei RT gelöst.

- 40 % TCA: 40 % (v/v) Trichloressigsäure (aus 100 % (w/v) TCA)
- 2 % DOC: 2 % (w/v) Desoxycholsäure Natriumsalz

4.2.3.8.1.2 TCA-Fällung von Proteinen aus ganzen Zellen

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts pro Zelle wurde 1 ml Kultur in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Extraktion und Präzipitation der Proteine erfolgte durch Zugabe von TCA bis zu einer Endkonzentration von 10 % und 20-minütige Inkubation auf Eis. Die präzipitierten Proteine wurden für 10 min bei 15.000 g und 4 °C sedimentiert und anschließend in 0,5 ml 1 M NaOH gelöst. Die Resuspension

wurde dabei durch Inkubation bei RT für mindestens 16 h gefördert. Unlösliche Partikel wurden durch einminütige Zentrifugation bei 2.200 g und RT sedimentiert und die Proteinkonzentration des Überstands nach Lowry bestimmt (4.2.3.8.2).

- TCA-Stammlösung: 100 % (w/v) Trichloressigsäure

4.2.3.8.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Für eine exakte Konzentrationsbestimmung wurden 100 µl der in 1 M NaOH gelösten Proteine (4.2.3.8.1.1 oder 4.2.3.8.1.2) mit 900 µl Lowry-Lösung gemischt und nach Zugabe von 100 µl Folinreagenz für 45 min im Dunkeln inkubiert. Unlösliche Partikel wurden durch fünfminütige Zentrifugation bei 15.000 g entfernt und die Extinktion des Überstands bei 750 nm in einem Spektralphotometer (Novaspec III Visible Spectrophotometer, GE Healthcare, München) vermessen. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden BSA-Lösungen bekannter Konzentration unter den gleichen Bedingungen präzipitiert (4.2.3.8.1.1 bzw. 4.2.3.8.1.2) und parallel behandelt. Anhand der Steigung wurde die Konzentration der Proteinproben berechnet.

- Lowry-Lösung: 5 ml l⁻¹ 2 % (w/v) K-Na-Tartrat
5 ml l⁻¹ 5 % (w/v) CuSO₄ · 5 H₂O
in 2% Na₂CO₃
- Folin-Reagenz: 50 % Folin-Ciocalteu-Reagenz

4.2.3.8.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur schnellen Bestimmung der Konzentration in Lösung befindlicher Proteine kam eine kalorimetrische Bestimmung nach Bradford [309] ohne vorherige Präzipitation der Proteine zur Anwendung. Ein Aliquot der zu untersuchenden Probe wurde mit Bradford-Reagenz (Quick Start™ Bradford 1x Dye, Bio-Rad, München) auf 1 ml aufgefüllt und nach fünfminütiger Inkubation bei RT die Extinktion bei 595 nm gegen einen proteinfreien Leerwert ermittelt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand der Steigung einer parallel erstellten BSA-Eichgeraden.

4.2.3.9 Elektrophoretische Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen

4.2.3.9.1 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli

Die Auftrennung von Proteinlösungen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte durch PAGE in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS). Zur Überprüfung der Proteinkonzentration und Reinheit sowie der Analyse der KaiC-Phosphorylierungsformen wurde dabei das diskontinuierliche Gelsystem nach Laemmli [310] verwendet. Dabei wurde die Gesamt-Polyacrylamidkonzentration (T) im Trenngel dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine angepasst. Für Standardgele wurde ein Vernetzungsgrad von Acrylamid und Bisacrylamid (C) von 3,3 % gewählt. Die Trennung der KaiC-Phosphorylierungsformen erfolgte in Gelen mit 0,67 % C (4.2.3.15).

Die Proben wurden in reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und anschließend denaturiert. Dazu wurden Zellextrakte für 20 min bei 50 °C inkubiert. Die Denaturierung aller anderen proteinhaltigen Lösungen erfolgte für 5 min bei 95 °C. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 16.000 g und RT wurden die Proteine zusammen mit einem Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, St. Leon-Roth) auf das polymerisierte Gel aufgetragen. Bei Standardgelen wurde zunächst eine Spannung von 100 V angelegt, die nach dem Übertritt der Proteine in das Trenngel auf 150-180 V erhöht wurde. Zur Trennung der KaiC-Phosphorylierungsstufen wurden Spannungen von 70-150 V verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine durch Färbung mit Coomassie dargestellt.

- Trenngelpuffer: 0,375 M Tris-HCl pH 8,8
- Sammelgelpuffer: 0,125 M Tris-HCl pH 6,8
- Acrylamid: 30 % (w/v) Acrylamid
(Rotiphorese® Gel A, Carl Roth, Karlsruhe)
- Bisacrylamid: 2 % (w/v) N.N-Methylenbisacrylamid
(Rotiphorese® Gel B, Carl Roth, Karlsruhe)
- Probenpuffer (5x): 250 mM Tris-HCl, pH 6,8
50 % (v/v) Glycerin
10 % (w/v) SDS
200 mM DTT
0,5 % (w/v) Bromphenolblau
- Laufpuffer: 250 mM Tris
0,1 % (w/v) SDS
0,192 M Glycin

4.2.3.9.2 Tricin-SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow

Zur qualitativen Analyse von Proteinpräparationen kam alternativ eine Tricin-SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow [311] zum Einsatz. Diese wurde zudem durchgeführt, wenn der Transfer der separierten Proteine auf eine PVDF-Membran (4.2.3.12) vorgesehen war. Dabei wurde ein Gel mit dreistufiger Polyacrylamidkonzentration (18 % Trenngel, 10,6 % Spacergel, 5,8 % „Sammelgel“ oder 12 % Trenngel, 5,9 % Spacergel, 5,5 % „Sammelgel“) gewählt. Der Vernetzungsgrad von Acrylamid und Bisacrylamid lag bei 3 %. Die Probenvorbereitung erfolgte analog der Beschreibung in Abschnitt (4.2.3.9.1) Während des Gellaufs wurde die Spannung schrittweise von 70 V auf 160 V erhöht.

- Gelpuffer:

Im Trenngel:	1 M Tris, pH 8,45; 0,1 % SDS
Im Spacergel:	1 M Tris, pH 8,45; 0,1 % SDS
Im „Sammelgel“:	0,75 M Tris, pH 8,45; 0,075 % SDS
- Acrylamidmix: 49,5 % (w/v) Acrylamid / N.N-Methylenbisacrylamid (32:1)
- Kathodenpuffer:

0,1 M Tris
0,1 M Tricin
0,1 % SDS; pH 8,25
- Anodenpuffer: 0,1 M Tris, pH 8,9

4.2.3.10 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Separation unter nativen Bedingungen wurden Aliquots der zu untersuchenden Proben mit Probenpuffer versetzt und auf Fertig-PAA-Gele geladen (SERVAGelTMN 4-16 vertical native gels, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg). Zur besseren Zuordnung der Banden wurde ein Molekulargewichtsmarker (SERVA Native Marker, Liquid Mix for BN/CN SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) appliziert. Die Elektrophorese erfolgte ü. N. bei 4 °C und 100-150 V. Anschließend wurden die Proteine durch eine Färbung mit Coomassie visualisiert (4.2.3.11).

- Anodenpuffer: 50 mM BisTris, pH 7,0
- Kathodenpuffer:

50 mM Tricin
15 mM BisTris
1 mM ATP
- Probenpuffer (2x):

100 mM NaCl
100 mM Imidazol

4 mM 6-Aminocaprinsäure
 2 mM EDTA
 0,02 % Ponceau S
 20 % Glycerin

4.2.3.11 Coomassiefärbung von Proteinen

Um Proteinbanden darzustellen, wurden die PAA-Gele nach der elektrophoretischen Auftrennung (4.2.3.9-4.2.3.10) kurz in VE-Wasser gespült und die Proteine anschließend durch fünfminütiges Schwenken in Fixierlösung fixiert. Nach der Färbung der Proteine mit Coomassie-Färbelösung für mindestens 10 min wurde das Gel durch abwechselndes Schwenken in Fixierlösung und 7 % Essigsäure entfärbt. Die Intensität der Proteinbanden wurde mithilfe des Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) sowie der Software *ImageLab* (Bio-Rad) analysiert. Anschließend wurden die Gele zur längeren Aufbewahrung bei 80 °C für 60-120 min unter Vakuum getrocknet.

- Coomassie-Färbelösung: 50 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Essigsäure
 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250
 (Rotiphorese® Blau R, Carl Roth, Karlsruhe)
- Fixierlösung: 50 % (v/v) Ethanol
 10 % (v/v) Essigsäure

4.2.3.12 Immuno-Blot-Analyse

Zur spezifischen Identifikation der durch Tricin-SDS-PAGE (4.2.3.9.2) aufgetrennten Proteine wurden diese auf eine PVDF-Membran (Roti®-PVDF; Porengröße 0,45 µm, Carl Roth, Karlsruhe) transferiert und durch Antikörper markiert.

Der Proteintransfer erfolgte mittels Westernblotting im Semi-Dry-Verfahren nach Kyhse-Anderson [312]. Das PAA-Gel wurde für 15-30 min in Kathodenpuffer äquilibriert, die PVDF-Membran durch Eintauchen in MeOH zunächst aktiviert und nach kurzem Spülen in dH₂O für mindestens 5 min in Anodenpuffer äquilibriert. Membran, Gel und ebenfalls in den entsprechenden Puffern getränkte Filterpapiere (Rotilabo®-Blottingpapiere, Dicke 1,0 mm, Carl Roth, Karlsruhe) wurden luftblasenfrei nach Herstellerangaben (Bio-Rad, München) zwischen Anode und Kathode platziert. Der Transfer erfolgte je nach Polyacrylamidkonzentration des Gels und Größe der zu detektierenden Proteine bei

1-2 mA cm⁻² für 45-90 min. Die immobilisierten Proteine konnten durch kurzes Schwenken in Ponceaulösung angefärbt werden.

Zur Immuno-Detektion ausgewählter Proteine wurde die Membran für 45 min in Blockierungspuffer geschwenkt, um freie Bindungsstellen zu sättigen. Anschließend folgte die Inkubation mit einem spezifischen primären Antikörper bei 4 °C und ü. N oder für wenige Stunden bei RT. Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Schwenken in TBST für je mindestens 10 min bei RT entfernt und die Membran mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die detektierten Proteine indirekt durch Oxidation von Luminol durch die an den Antikörper konjugierte Peroxidase sichtbar gemacht. Die Entwicklung erfolgte dabei mit dem Immobilon™ Western Kit (Merck Milipore, Darmstadt). Lichtquanten wurden auf einem Röntgenfilm oder zur Quantifizierung am Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, München) detektiert und mit der Software *ImageLab* (Bio-Rad, München) ausgewertet.

- Anodenpuffer: 10 % Roti®-BlotA, 10 x Puffer (Carl Roth, Karlsruhe)
20 % Ethanol
- Kathodenpuffer: 10 % Roti®-BlotK, 10 x Puffer (Carl Roth, Karlsruhe)
20 % Ethanol
- Ponceaulösung: 0,02 % Ponceau S in 0,3 % TCA
- TBST: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
0,1 % (v/v) Tween 20
- Blockierungspuffer: 5 % Milchpulver oder 5 % BSA in TBST

Die Antikörper wurden wie in (Tabelle 4-7) angegeben in TBST verdünnt

4.2.3.12.1 Entfernen gebundener Antikörper (*Stripping*)

Gebundene Antikörper wurden unter Verwendung des *Thermo Restore plus western blot stripping buffer* (Thermo Scientific, St. Leon-Roth) nach Herstellerangaben von der Membran entfernt, so dass diese einer erneuten Immuno-Detektion unterzogen werden konnte.

4.2.3.12.2 Quantifizierung der Kai-Proteinmenge

4.2.3.12.2.1 Relative Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Kai-Proteine in Zellextrakten mit bekannter Gesamtproteinkonzentration wurde eine Eichgerade erstellt. Dazu wurde auf Basis der Gesamtproteinkonzentration eine Verdünnungsreihe eines Kontroll-Gesamtzellextrakts (Kontrolle) erstellt. Diese wurde zusammen mit definierten Mengen des zu untersuchenden Zellextrakts aufgetrennt und einem Immuno-*Blotting* unterzogen. Die Signalintensität der Kai-Proteinbanden in den Proben der Verdünnungsreihe wurde mit der Software *ImageLab* (Bio-Rad, München) bestimmt und gegen die applizierte Gesamtproteinmenge aufgetragen. Mithilfe der Geradengleichung konnte anschließend die Kai-Proteinmenge in den zu untersuchenden Zellextrakten bezogen auf die Kontrolle berechnet werden.

$$\text{Geradengleichung: } \text{Intensität} = A \times \text{Gesamtprotein}_{\text{Kontrolle}} - B$$

$$\text{Kai-Protein}_{\text{rel.}} = \frac{\frac{(\text{Intensität} + B)}{A}}{\text{Gesamtprotein}_{\text{Extrakt}}}$$

4.2.3.12.2.2 Absolute Quantifizierung

Die absolute Quantifizierung der Kai-Proteine erfolgte anhand einer Verdünnungsreihe des entsprechenden rekombinanten Kai-Proteins, mithilfe derer analog zu Punkt 4.2.3.12.2.1 eine Eichgerade erstellt wurde. Mithilfe der Eichgerade wurde die Kai-Protein-Menge im Gesamtzellextrakt mit 1 µg Protein berechnet.

$$\text{Geradengleichung: } \text{Intensität} = A \times \text{Proteinmenge}_{\text{Kai}_{\text{rekomb.}}} - B$$

$$\text{Kai-Protein}_{\text{abs.}} = \frac{\frac{(\text{Intensität} + B)}{A}}{\text{Gesamtprotein}_{\text{Extrakt}}}$$

Unter Berücksichtigung des Gesamtproteingehalts pro Zelle konnte die Kai-Proteinmenge (m_{Kai}) pro Zelle berechnet werden. Aus dieser ließ sich unter Berücksichtigung der atomaren Masseneinheit ($1 \text{ u} = 1 \text{ Da} = 1,660538921 \times 10^{-24} \text{ g}$) und der Molekülmasse des analysierten Kai-Proteins (M_{Kai}) über die atomare Masse ($m_{\text{A-Kai}}$) die Zahl der Kai-Moleküle (N_{Kai}) pro Zelle berechnen.

$$m_{\text{A-Kai}} = \frac{u \times M_{\text{Kai}}}{1 \text{ Da}}$$

$$N_{Kai} = \frac{m_{Kai}}{m_{A-Kai}}$$

Dies sei exemplarisch für KaiA₆₈₀₃ mit einer Molekülmasse von 34.893,6 Da dargestellt, das mit $0,12 \times 10^{-15}$ g pro Zelle detektiert wurde:

$$m_{A-KaiA6803} = \frac{1,660538921 \times 10^{-24} \text{ g} \times 34.893,6 \text{ Da}}{1 \text{ Da}} = 5,7942 \times 10^{-20} \text{ g}$$

$$N_{KaiA6803} = \frac{0,12 \times 10^{-15}}{5,7942 \times 10^{-20} \text{ g}} = 2071$$

4.2.3.12.2.3 Berechnung der Amplitude potenzieller Proteinoszillationen

Die Amplitude potenzieller Oszillationen wurde nach Ito *et al.* [21] als Koeffizient der Varianz aller Messwerte einer Zeitreihe berechnet.

$$\text{Amplitude} = \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}}$$

4.2.3.13 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

4.2.3.13.1 Fixierung, Dehydrierung und Polymerisierung von *Synechocystis*-Zellen

Zur Untersuchung von *Synechocystis*-Zellen unter dem Transmissions-Elektronenmikroskop wurden diese zunächst fixiert und in *LR white* eingebettet: Zellen aus 30 ml Kultur wurden durch Zentrifugation geerntet (4.2.3.1.2), in Phosphatpuffer aufgenommen und bei 3.400 g und RT für 2 min sedimentiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 500 µl 3 % Paraformaldehyd resuspendiert, für 15 min bei RT fixiert und erneut bei 3.400 g und RT für 2 min pelletiert. Es folgten drei Waschschrte, bei denen das Sediment jeweils mit 1 ml Phosphatpuffer gemischt und durch Zentrifugation für 5 min bei 3.400 g und RT von diesem separiert wurde. Abschließend wurden die Zellen in 250 µl Phosphatpuffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 8 °C gelagert. Zur Dehydrierung wurde der Puffer nach Zentrifugation für 1 min bei 5.000 g und RT entfernt und die Zellen mit einem Volumen flüssiger 2 % Agarose gemischt. Die Agarose wurde ü. N. bei 8 °C abgekühlt und das erstarrte Pellet anschließend mit einem Skalpell in ca. 1-2 mm³ große Würfel geschnitten. In einem Glasröhrchen wurden die Würfel schrittweise für 15 min in 30 %, 50 %, 70 % und 90 % EtOH bei RT unter sanfter Rotation (2 rpm min⁻¹) inkubiert und abschließend dreimal für 20 min in

100 % EtOH vollständig dehydriert. Der Austausch der Lösungen erfolgte dabei durch vorsichtiges Absaugen mit einer Pasteurpipette. Die wasserfreien Zellwürfel wurden zur Infiltration mit *LR white* (Sigma, Dorset, England,) in Glasröhrchen unter stetiger Rotation mit 2 rpm min⁻¹ und bei RT für 1 h in 50 % *LR white*, 1h in 100 % *LR white* und ü. N. erneut in 100 % *LR white* inkubiert. Gelatine-Kapseln wurden mit der Suspension befüllt und diese durch Inkubation bei 54 °C für zwei Tage anaerob polymerisiert.

- Phosphatpuffer: 0,125 M Natrium-Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,2

0,45 l l⁻¹ 0,2 M Na₂HPO₄
0,15 l l⁻¹ 0,2 M KH₂PO₄
- 3 % Paraformaldehyd: 3 % (w/v) Paraformaldehyd in 0,125 M Phosphatpuffer, pH 7,2
- 2 % Agarose: 2 % (w/v) Agarose in 0,125 M Phosphatpuffer, pH 7,2
erhitzt auf 70 °C
- 50 % *LR white* 50 % *LR white* in EtOH

4.2.3.13.2 Präparation von Zelldünnschnitten auf Pioloform-beschichteten Nickel-Netzträgern

Ein Standard-Glas-Objektträger wurde zunächst mit einem dünnen Papier abgerieben, um ihn durch das Oberflächenfett der Haut leicht einzufetten. Anschließend wurde er nach kurzem Eintauchen in Pioloformlösung für 5 min bei RT getrocknet. Der entstandene Pioloformfilm wurde mit einer Rasierklinge an den Rändern des Objektträgers eingeschnitten und durch vorsichtiges Eintauchen in ein Wasserbad an der Wasseroberfläche abgelöst. Nickel-Netzträger (Hex 300 High Trans Nickel, Agar Scientific, Stansted, England) wurden auf dem schwimmenden Pioloformfilm abgelegt, mit einem dünnen Filterpapier abgezogen und ü. N. getrocknet. Anschließend wurden Ultrazelldünnschnitte der eingebetten Zellen (4.2.3.13.1) auf den beschichteten Nickel-Netzträgern platziert. Die Ultradünnschnitte wurden von Giulia Mastroianni (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Conrad Mullineaux, *Queen Mary University*, London, England) an einem Ultramikrotom bereitet.

- Pioloformlösung: 0,4 % (w/v) Pioloform (Polyvinyl Butyral) in Chloroform

4.2.3.13.3 Immuno-Gold-Labeling

Die Lokalisation ausgewählter Proteine in den präparierten Zelldünnschnitten erfolgte durch spezifische Primärantikörper, die indirekt durch die Bindung eines mit Goldpartikeln konjugierten Sekundärantikörpers elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht wurden. Für die nachfolgend beschriebenen Inkubations- und Waschschrte wurden Tropfen der entsprechenden Lösung auf einen Parafilm oder in eine spezielle Silikonform gegeben und die Nickel-Netzträger mit den Zelldünnschnitten bei RT darauf platziert. Initial wurden die Zelldünnschnitte für 5 min mit H_2O_2 inkubiert und proteinfreie Stellen nach zweimaligem fünfminütigem Waschen für 1 h in 10 % BSA blockiert. Es folgte die Inkubation mit spezifischen Primärantikörpern, die, wie in Tabelle 4-7 angegeben, in PBS verdünnt wurden. Als Negativkontrolle wurden Dünnschnitte auf 10 % BSA in Abwesenheit eines Antikörpers platziert. Ungebundene Antikörper wurden durch sechsmaliges zweiminütiges Waschen mit PBS entfernt und die Dünnschnitte mit dem Gold-konjugierten Sekundärantikörper (Sigma, Dorset, England, verdünnt in PBS) inkubiert. Nach weiteren Waschschrten (dreimal 2 min 10 % BSA, dreimal 2 min PBS, dreimal 1 min H_2O) wurden die Zellen gefärbt. Dazu erfolgte nacheinander eine jeweils vierminütige Inkubation mit gesättigtem wässrigen Uranylacetat und Bleicitrat auf einem Wachsbett. Zwischen und nach den Färbeschrten wurden die Sektionen durch zehnmaliges kurzes Eintauchen in H_2O gewaschen.

- PBS: 137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na_2HPO_4
1,8 mM KH_2PO_4
pH 7,4
- 10 % BSA 10 % (w/v) BSA in PBS
- Bleicitrat: 0,266 g l^{-1} Bleicitrat
0,352 g l^{-1} Tri-Natriumcitrat
0,16 M NaOH

4.2.3.13.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Nach dem Immuno-Gold-Labeling verschiedener Proteine und der Färbung mit Uranylacetat und Bleicitrat (4.2.3.13.3) erfolgte die Mikroskopie der Zelldünnschnitte unter einem JEOL JEM-1230 Elektronenmikroskop bei 60.000- bis 250.000-facher Vergrößerung. Dabei wurden die Bilder mit einer CCD-Kamera visualisiert und mit ImageJ analysiert.

4.2.3.13.5 Klassifizierung von cytosolischen und membranständigen Proteinen

Die Zellfläche wurde anhand der bekannten Vergrößerung gemessen und die Zahl der Goldpartikel pro μm^2 Zelle manuell gezählt. Goldpartikel mit maximal 15 nm Entfernung zu Membranstrukturen wurden als membranassoziiert klassifiziert und dementsprechend für jede analysierte Zelle der prozentuale Goldpartikelanteil an der Thylakoidmembran, Cytoplasmamembran oder dem Cytosol bezogen auf die Gesamtpartikelzahl berechnet. Durch die Verrechnung des Goldpartikelanteils in *Synechocystis* Wildtypzellen und Zellen geeigneter Deletionsmutanten, konnte der membranständige bzw. cytosolische Anteil von KaiA, KaiC1 und KaiC3 im Wildtyp abgeschätzt werden. Dies sei exemplarisch für KaiA₆₈₀₃ veranschaulicht:

Unter der Annahme, dass im *Synechocystis* Wildtyp (WT) gleich viele Proteine unspezifisch gebunden wurden wie in *Synechocystis* ΔkaiABC , wurde zunächst der Anteil unspezifisch detektierter Goldpartikel pro μm^2 Zelle berechnet:

$$P_{\text{unsp}} \frac{1,94 \text{ Partikel } \mu\text{m}^{-2} (\Delta\text{kaiABC})}{6,15 \text{ Partikel } \mu\text{m}^{-2} (\text{WT})} = 0,32$$

Daraus ergab sich der Anteil spezifisch an KaiA₆₈₀₃ gebundener Partikel:

$$P_{\text{KaiA}} = 1 - 0,32 = 0,68$$

Nun konnte auf Basis des Anteils Thylakoid-assoziiierter Partikel (P_{Th}) in Wildtyp (WT) und Deletionsmutante (ΔkaiABC) der prozentuale Anteil des KaiA₆₈₀₃ an der Thylakoidmembran berechnet werden:

$$\text{KaiA}_{\text{Th}} = \frac{(P_{\text{Th}} (\text{WT}) - P_{\text{unsp}} \times P_{\text{Th}} (\Delta\text{kaiABC})) * 100 \%}{P_{\text{KaiA}}}$$

$$\text{KaiA}_{\text{Th}} = \frac{(0,62 - 0,32 \times 0,45) * 100 \%}{0,68} = 70 \%$$

4.2.3.14 Generierung von Antikörpern

Mit der Produktion von Antikörpern zur spezifischen Detektion der Kai-Proteine aus *Synechocystis* wurde die Firma *Pineda Antikörper-Services* (Berlin) beauftragt.

Vorab wurden Westernblot-Analysen mit von der Firma zur Verfügung gestellten Präimmunseren durchgeführt. Diese sollten ausschließen, dass die zu immunisierenden Kaninchen bereits Antikörper produziert hatten, die Proteine mit ähnlicher Größe zu den entsprechenden Kai-Proteinen in *Synechocystis*- oder *E. coli*-Gesamtzellextrakten erkennen. Definierte Mengen der Gesamtzellextrakte wurden elektrophoretisch separiert und auf eine Membran transferiert. Im Rahmen des Immuno-*Blottings* wurde 5 % BSA in TBST als Blockierlösung eingesetzt und die Präimmunseren 1:5.000 verdünnt in TBST verwendet.

Zur Bildung eines KaiA₆₈₀₃-gerichteten Antikörpers wurde rekombinantes KaiA₆₈₀₃ durch fünfminütige Inkubation bei 95 °C in Anwesenheit von 5 % SDS und 100 mM DTT denaturiert und anschließend von der beauftragten Firma zur Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet. Als Antigen zur Produktion spezifischer KaiB- und KaiC-Antikörper dienten die in Tabelle 4-7 genannten Peptide, die an einen Proteincarrier gekoppelt wurden. Deren Synthese sowie die Immunisierung von jeweils zwei Kaninchen erfolgten ebenfalls firmenseitig.

4.2.3.15 Studien zur *in vitro* Aktivität der Kai-Proteine

Zur Charakterisierung der Phosphorylierung (im Falle von KaiC), Aktivität und Interaktion der Kai-Proteine wurden diese unter den angegebenen Bedingungen inkubiert. Dabei kam, wenn nicht anders vermerkt, Reaktionspuffer zum Einsatz. Die Komplexbildung wurde anschließend durch native PAGE (4.2.3.10), der Phosphorylierungszustand durch denaturierende PAGE (4.2.3.15.1) analysiert.

- Reaktionspuffer: 20 mM Tris-HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
0,5 mM EDTA
5 mM MgCl₂
1 mM ATP

4.2.3.15.1 Darstellung der Phosphorylierungsformen des KaiC

Die Phosphorylierung konnte durch Auftrennung in PAA-Gelen mit niedrigem Vernetzungsgrad von Acrylamid- und Bisacrylamid (0,67 % C, 4.2.3.9.1) dargestellt werden, da die phosphorylierten Formen des KaiC in diesem Gelsystem langsamer migrieren als das dephosphorylierte Protein [56,92]. Nach Färbung durch Coomassie wurde die Signalintensität der Banden mit *ImageLab* (Bio-Rad, München) analysiert (4.2.3.11).

4.2.3.15.1.1 Quantifizierung der KaiC₇₉₄₂-Phosphorylierung

Anhand der Migrationsgeschwindigkeit wurden die Banden nach Nishiwaki *et al.* [14] den Phosphorylierungsstufen des KaiC₇₉₄₂ ($\text{KaiC}^{\text{pS/pT}} \rightarrow \text{KaiC}^{\text{S/pT}} \rightarrow \text{KaiC}^{\text{pS/T}} \rightarrow \text{KaiC}^{\text{S/T}}$; langsam \rightarrow schnell) zugeordnet. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der einzelnen Phosphorylierungsformen in Bezug auf alle KaiC-Banden ermittelt. Zur Bestimmung des Gesamtphosphorylierungsgrades wurde die Signalintensität der langsamer migrierenden Banden ($\text{KaiC}^{\text{pS/pT}}$, $\text{KaiC}^{\text{S/pT}}$ und $\text{KaiC}^{\text{pS/T}}$) durch die Signalintensität aller Banden dividiert.

4.2.3.15.2 Kai₇₉₄₂-Funktionalitätstest

Um die Aktivität von KaiA₇₉₄₂, KaiB₇₉₄₂ und KaiC₇₉₄₂ zu verifizieren, wurde standardmäßig getestet ob KaiA₇₉₄₂ und KaiB₇₉₄₂ die Phosphorylierung des KaiC₇₉₄₂ antagonistisch beeinflussen können. Dazu wurde KaiC₇₉₄₂ (i) in Abwesenheit anderer Proteine, (ii) in Anwesenheit von KaiA₇₉₄₂ und (iii) in Anwesenheit von KaiA₇₉₄₂ und KaiB₇₉₄₂ für 16 Stunden bei 30 °C inkubiert. Bei voller Funktionalität aller Proteine lag KaiC₇₉₄₂ anschließend (i) dephosphoryliert, (ii) phosphoryliert bzw. (ii) dephosphoryliert vor. Dies liegt darin begründet, dass die Phosphorylierung des KaiC₇₉₄₂ bei 30 ° nur in Anwesenheit von KaiA₇₉₄₂ gesteigert wird. In Anwesenheit von KaiA₇₉₄₂ und KaiB₇₉₄₂ durchläuft KaiC₇₉₄₂ einen Phosphorylierungszyklus, in dem nach 16 Stunden die dephosphorylierte Form dominiert.

Eine vergleichbare Analyse erfolgte im Rahmen von Komplementations-Studien mit KaiA₆₈₀₃ und KaiB1.

4.2.3.15.3 Dephosphorylierung von Proteinen mit Lambda-Protein-Phosphatase

Zur Dephosphorylierung von Serin-, Threonin- (und Tyrosin-)Resten wurden definierte Mengen der KaiC-Proteine mit 20-40 U μl^{-1} Lambda-Protein-Phosphatase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) ü. N. inkubiert. Dabei wurde der vom Hersteller mitgelieferte Puffer verwendet und teilweise ein Phosphatase-Inhibitor (Phosphatase-Inhibitor-Cocktail, Roche, Berlin) zugegeben.

Die Dephosphorylierung von Proteinen in Zellextrakten erfolgte analog.

4.2.3.15.4 Bestimmung der Kinase-Aktivität

Zur Bestimmung der *in vitro* Kinase-Aktivität wurden $0,2 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ der jeweiligen KaiC-Präparation mit $1,6 \mu\text{Ci } [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert. Dabei erfolgte die Inkubation jeweils einmal ohne KaiA, und je einmal mit $0,1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ KaiA₇₉₄₂ bzw. $0,1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ KaiA₆₈₀₃. Nach den im Text angegebenen Zeitpunkten wurde die Phosphorylierung durch SDS-PAGE analysiert (4.2.3.15.1; 4.2.3.9.1). Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt (4.2.3.11) und das gebundene $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ anschließend durch Auflegen einer Phospho-Screen-Platte detektiert. Die Signale wurden mithilfe des Personal Molecular Imager FX (Bio-Rad, München) ausgelesen und unter Verwendung der Software *Quantity One* (Bio-Rad, München) ausgewertet.

4.2.3.15.5 Bestimmung der ATPase-Aktivität

Die ATP-Hydrolyse wurde kalorimetrisch über die Freisetzung anorganischen Phosphats gemessen. Dazu kam ein Malchitgrün-Assay nach Lanzetta [313] zum Einsatz.

Definierte Mengen KaiC in Reaktionspuffer wurden in $20 \mu\text{l}$ Aliquots aufgeteilt und je drei Ansätze für 24 Stunden bei 30°C und drei Aliquots (zur Kontrolle) bei -20°C inkubiert. Zur Bestimmung der Autohydrolyse von ATP diente die analoge Inkubation von Reaktionspuffer ohne Protein. Anschließend wurden $800 \mu\text{l}$ Farbreagenz und nach gründlichem Mischen $100 \mu\text{l}$ Stoppreagenz zugegeben. Nach 40-minütiger Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 650 nm oder 660 nm an einem Spektrophotometer (Novaspec III Visible Spectrophotometer, GE Healthcare, München) vermessen. Die Berechnung der freigesetzten Phosphatmoleküle erfolgte anhand einer Kalibrierungskurve, die durch die Vermessung von KH_2PO_4 -Lösungen bekannter Konzentration erstellt wurde.

Über die molare Masse des KaiC (M_{KaiC} , ermittelt mit dem *Onlinetool ExPASy-ProtParam*, [314]) wurde auf Basis der eingesetzten Proteinmenge (m_{KaiC}) und der gemessenen Phosphatmenge N_P die gebildete Phosphatmenge pro KaiC-Monomer berechnet.

$$N_{P/\text{KaiC}} = \frac{N_P [\text{mol}] \times M_{\text{KaiC}} [\text{g mol}^{-1}]}{m_{\text{KaiC}} [\text{g}]}$$

$$\text{z.B. } N_{P/\text{KaiC3}} = \frac{0,47 \times 10^{-9} \text{ mol} \times 56455,5 \text{ g mol}^{-1}}{0,877 \times 10^{-6}} = 29,7$$

4.2.3.15.6 Bestimmung der ATP-Synthase-Aktivität

Die ATP-Synthese wurde über die Bildung von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ aus $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$ verfolgt. Zur Detektion der Nukleotide diente eine Dünnschichtchromatografie mit anschließender Radiografie.

Je 3 μM KaiC wurden bei RT in An- oder Abwesenheit von 0,5 mM ADP mit 0,27 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$ (20 μCi) versetzt. Dabei kam Reaktionspuffer (4.2.3.15) mit nur 0,5 mM ATP zum Einsatz. Nach gründlichem Mischen wurde je ein Aliquot bei -20 °C gelagert und ein Aliquot für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Zur Separation der Nukleotide wurden anschließend je 0,5 μl der 1:20 verdünnten Reaktionsansätze auf eine Cellulose-Platte (TLC PEI Celulose F, Merck Millipore, Darmstadt) aufgetragen. Als Größenkontrolle dienten $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$ und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Als Laufmittel wurde 1 M LiCl verwendet. Die Platten wurden getrocknet und die radioaktiven Nukleotide mithilfe einer Phosphorscreen-Platte und dem Personal Molecular Imager FX Systems (Bio-Rad, München) detektiert. Die Auswertung der autoradiografischen Signale erfolgte mit der Software *ImageLab* (Bio-Rad, München). Zur Berechnung der relativen ATP-Synthese wurden die Intensitäten aller detektierten Signale (Startpunkt, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{AMP}$) addiert und der prozentuale Anteil des $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -Signals berechnet. Zur Normalisierung wurde anschließend der $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -Anteil in der -20 °C Probe mit 0,5 mM ADP abgezogen.

4.2.4 Sonstiges

4.2.4.1 Sequenzanalysen

Gen- und Proteinsequenzen wurden den Onlinedatenbanken Cyanoabse [198] oder NCBI [315] entnommen

4.2.4.1.1 BLAST-Analysen

Zur Bestimmung der Sequenzidentität verschiedener Kai-Proteine wurde die Aminosäuresequenz des zu untersuchenden Proteins mithilfe des *Onlinetools blastp* [316] gegen alle nicht-redundanten Proteinsequenzen des gewünschten Organismus geblastet. Die Bestimmung der Sequenzidentität von Genen erfolgte analog mit dem *Onlinetool blastn* [317].

4.2.4.1.2 Multiple Alignments

Ausgewählte Sequenzen wurden mit *Clustal Omega* [318-320] aligniert. Dabei wurden die Standardeinstellungen verwendet, die Sequenzen jedoch in der eingegebenen Reihenfolge sortiert. Die weitere Analyse erfolgte mit dem Programm *Genedoc* [321]. Dabei wurde die Identität zur oberen Sequenz dargestellt und der Konservierungsgrad in Graustufen angegeben:

- 100 % Konservierung: weiße Schrift auf schwarzem Grund
- 80 % Konservierung: weiße Schrift auf dunkelgrauem Grund
- 60 % Konservierung: schwarze Schrift auf hellgrauem Grund

4.2.4.2 Statistische Analysen

Wenn nicht anders angegeben, sind Werte als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

4.2.4.2.1 Zweistichproben t-Test

Um zu überprüfen ob sich zwei Stichproben signifikant unterscheiden, wurde ein Zweistichproben t-Test in *Excel* unter der Annahme unterschiedlicher oder gleicher Varianzen durchgeführt. Die Hypothese gleicher Varianzen wurde dafür mit einem Zweistichproben F-Test in *Excel* überprüft.

p-Werte $\leq 0,05$, 0,01 und 0,001 wurden als signifikant, sehr signifikant bzw. hoch signifikant gewertet.

4.2.4.2.2 Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)

Bei Gruppen von Stichproben wurde die Nullhypothese, dass keine Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen, durch eine einfaktorielle ANOVA-Analyse in *Excel* überprüft.

Bei p-Werten $\leq 0,05$ wurde die Null-Hypothese als nicht bestätigt angenommen, was bedeutet dass sich die Werte signifikant voneinander unterscheiden.

4.2.4.3 Diagramme

Diagramme zur Darstellung von Daten wurden in *Excel* erstellt.

5. Literatur

1. Ditty JL, Williams SB, Golden SS: A cyanobacterial circadian timing mechanism. *Annu Rev Genet* 2003, **37**:513-543.
2. Haydon MJ, Mielczarek O, Robertson FC, Hubbard KE, Webb AA: Photosynthetic entrainment of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Nature* 2013, **502**:689-692.
3. Edgar RS, Green EW, Zhao Y, van Ooijen G, Olmedo M, Qin X, Xu Y, Pan M, Valekunja UK, Feeney KA, et al.: Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* 2012, **485**:459-464.
4. McClung CR: Plant circadian rhythms. *Plant Cell* 2006, **18**:792-803.
5. Woelfle MA, Ouyang Y, Phanvijhitsiri K, Johnson CH: The adaptive value of circadian clocks: an experimental assessment in cyanobacteria. *Curr Biol* 2004, **14**:1481-1486.
6. Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, Golden SS, Johnson CH: Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:8660-8664.
7. Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kevei E, Toth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AAR: Plant Circadian Clocks Increase Photosynthesis, Growth, Survival, and Competitive Advantage. *Science* 2005, **309**:630-633.
8. Paranjpe DA, Sharma VK: Evolution of temporal order in living organisms. *J Circadian Rhythms* 2005, **3**:7.
9. Golden SS, Canales SR: Cyanobacterial circadian clocks - timing is everything. *Nat Rev Microbiol* 2003, **1**:191-199.
10. Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ: Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet* 2005, **6**:544-556.
11. Edmunds LN, Jr.: Chronobiology at the cellular and molecular levels: models and mechanisms for circadian timekeeping. *Am J Anat* 1983, **168**:389-431.
12. Johnson CH, Egli M: Metabolic compensation and circadian resilience in prokaryotic cyanobacteria. *Annu Rev Biochem* 2014, **83**:221-247.
13. Mackey SR, Golden SS: Winding up the cyanobacterial circadian clock. *Trends Microbiol* 2007, **15**:381-388.
14. Pittendrigh CS: Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol* 1993, **55**:16-54.
15. Kippert F: Endocytobiotic coordination, intracellular calcium signaling, and the origin of endogenous rhythms. *Ann N Y Acad Sci* 1987, **503**:476-495.
16. Johnson CH: Precise circadian clocks in prokaryotic cyanobacteria. *Curr Issues Mol Biol* 2004, **6**:103-110.
17. Johnson CH, Golden SS, Ishiura M, Kondo T: Circadian clocks in prokaryotes. *Mol Microbiol* 1996, **21**:5-11.
18. Golden SS, Ishiura M, Johnson CH, Kondo T: Cyanobacterial Circadian Rhythms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997, **48**:327-354.
19. Ma P, Woelfle MA, Johnson CH: An Evolutionary Fitness Enhancement Conferred by the Circadian System in Cyanobacteria. *Chaos Solitons Fractals* 2013, **50**:65-74.
20. Toepel J, Welsh E, Summerfield TC, Pakrasi HB, Sherman LA: Differential transcriptional analysis of the cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142 during light-dark and continuous-light growth. *J Bacteriol* 2008, **190**:3904-3913.
21. Ito H, Mutsuda M, Murayama Y, Tomita J, Hosokawa N, Terauchi K, Sugita C, Sugita M, Kondo T, Iwasaki H: Cyanobacterial daily life with Kai-based circadian and diurnal genome-wide transcriptional control in *Synechococcus elongatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:14168-14173.
22. Kucho K, Aoki K, Itoh S, Ishiura M: Improvement of the bioluminescence reporter system for real-time monitoring of circadian rhythms in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Genes Genet Syst* 2005, **80**:19-23.

23. **Kushige H, Kugenuma H, Matsuoka M, Ehira S, Ohmori M, Iwasaki H:** Genome-wide and heterocyst-specific circadian gene expression in the filamentous Cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* 2013, **195**:1276-1284.
24. **Pennebaker K, Mackey KR, Smith RM, Williams SB, Zehr JP:** Diel cycling of DNA staining and *nifH* gene regulation in the unicellular cyanobacterium *Crocospaera watsonii* strain WH 8501 (Cyanophyta). *Environ Microbiol* 2010, **12**:1001-1010.
25. **Onai K, Morishita M, Itoh S, Okamoto K, Ishiura M:** Circadian rhythms in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*: compensation of period length over a wide temperature range. *J Bacteriol* 2004, **186**:4972-4977.
26. **Smith RM, Williams SB:** Circadian rhythms in gene transcription imparted by chromosome compaction in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:8564-8569.
27. **Vijayan V, Zuzow R, O'Shea EK:** Oscillations in supercoiling drive circadian gene expression in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:22564-22568.
28. **Dong G, Yang Q, Wang Q, Kim YI, Wood TL, Osteryoung KW, van Oudenaarden A, Golden SS:** Elevated ATPase activity of KaiC applies a circadian checkpoint on cell division in *Synechococcus elongatus*. *Cell* 2010, **140**:529-539.
29. **Mori T, Binder B, Johnson CH:** Circadian gating of cell division in cyanobacteria growing with average doubling times of less than 24 hours. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:10183-10188.
30. **Mori T, Johnson CH:** Independence of circadian timing from cell division in cyanobacteria. *J Bacteriol* 2001, **183**:2439-2444.
31. **Yang Q, Pando BF, Dong G, Golden SS, van Oudenaarden A:** Circadian gating of the cell cycle revealed in single cyanobacterial cells. *Science* 2010, **327**:1522-1526.
32. **Mitsui A, Kumazawa S, Takahashi A, Ikemoto H, Cao S, Arai T:** Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature* 1986, **323**:720-722.
33. **Sweeney BM, Borgese MB:** A circadian rhythm in cell division in a prokaryote, the cyanobacterium *Synechococcus* WH7803. *J Phycol* 1989, **25**:183-186.
34. **Chen TH, Chen TL, Hung LM, Huang TC:** Circadian Rhythm in Amino Acid Uptake by *Synechococcus* RF-1. *Plant Physiol* 1991, **97**:55-59.
35. **Yen UC, Huang TC, Yen TC:** Observation of the circadian photosynthetic rhythm in cyanobacteria with a dissolved-oxygen meter. *Plant Science* 2004, **166**:949-952.
36. **Roenneberg T, Carpenter EJ:** Daily Rhythm of O₂-Evolution in the Cyanobacterium *Trichodesmium-Thiebautii* under Natural and Constant Conditions. *Marine Biology* 1993, **117**:693-697.
37. **Huang TC, Chow TJ:** New Type of N₂-Fixing Unicellular Cyanobacterium (Blue-Green-Alga). *Fems Microbiology Letters* 1986, **36**:109-110.
38. **Huang TC, Chow TJ:** Characterization of the Rhythmic Nitrogen-Fixing Activity of *Synechococcus* Sp Rf-1 at the Transcription Level. *Current Microbiology* 1990, **20**:23-26.
39. **Grobelaar N, Huang TC, Lin HY, Chow TJ:** Dinitrogen-Fixing Endogenous Rhythm in *Synechococcus* Rf-1. *Fems Microbiology Letters* 1986, **37**:173-177.
40. **Holtzendorff J, Partensky F, Mella D, Lennon JF, Hess WR, Garczarek L:** Genome streamlining results in loss of robustness of the circadian clock in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* PCC 9511. *J Biol Rhythms* 2008, **23**:187-199.
41. **Schneegurt MA, Sherman DM, Nayar S, Sherman LA:** Oscillating behavior of carbohydrate granule formation and dinitrogen fixation in the cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142. *J Bacteriol* 1994, **176**:1586-1597.
42. **Kondo T, Mori T, Lebedeva NV, Aoki S, Ishiura M, Golden SS:** Circadian rhythms in rapidly dividing cyanobacteria. *Science* 1997, **275**:224-227.
43. **Millineaux PM, Gallon JR, Chaplin AE:** Acetylene reduction (nitrogen fixation) by cyanobacteria grown under alternating light-dark cycles. *FEMS Microbiology Letters* 1981, **10**:245-247.

44. **Berman-Frank I, Lundgren P, Falkowski P:** Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res Microbiol* 2003, **154**:157-164.
45. **Golden SS:** Integrating the circadian oscillator into the life of the cyanobacterial cell. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2007, **72**:331-338.
46. **Thiel T:** Genetic Analysis of Cyanobacteria. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Edited by Bryant DA: Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moskau; 2004.
47. **Shestakov SV, Khyen NT:** Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Mol Gen Genet* 1970, **107**:372-375.
48. **Johnson CH, Xu Y:** The Decade of Discovery: How *Synechococcus elongatus* became A model circadian system 1990-2000. In *Bacterial Circadian Programs*. Edited by Ditty JL, Mackey SR, Johnson CH: Springer Verlag Berlin-Heidelberg; 2009.
49. **Kondo T, Strayer CA, Kulkarni RD, Taylor W, Ishiura M, Golden SS, Johnson CH:** Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:5672-5676.
50. **Kondo T, Ishiura M:** Circadian rhythms of cyanobacteria: monitoring the biological clocks of individual colonies by bioluminescence. *J Bacteriol* 1994, **176**:1881-1885.
51. **Liu Y, Tsinoremas NF, Johnson CH, Lebedeva NV, Golden SS, Ishiura M, Kondo T:** Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genes & Development* 1995, **9**:1469-1478.
52. **Kondo T, Tsinoremas NF, Golden SS, Johnson CH, Kutsuna S, Ishiura M:** Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science* 1994, **266**:1233-1236.
53. **Ishiura M, Kutsuna S, Aoki S, Iwasaki H, Andersson CR, Tanabe A, Golden SS, Johnson CH, Kondo T:** Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* 1998, **281**:1519-1523.
54. **Qin X, Byrne M, Xu Y, Mori T, Johnson CH:** Coupling of a core post-translational pacemaker to a slave transcription/translation feedback loop in a circadian system. *PLoS Biol* 2010, **8**:e1000394.
55. **Iwasaki H, Williams SB, Kitayama Y, Ishiura M, Golden SS, Kondo T:** A kaiC-interacting sensory histidine kinase, SasA, necessary to sustain robust circadian oscillation in cyanobacteria. *Cell* 2000, **101**:223-233.
56. **Iwasaki H, Nishiwaki T, Kitayama Y, Nakajima M, Kondo T:** KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in circadian timing loops in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:15788-15793.
57. **Imai K, Nishiwaki T, Kondo T, Iwasaki H:** Circadian rhythms in the synthesis and degradation of a master clock protein KaiC in cyanobacteria. *J Biol Chem* 2004, **279**:36534-36539.
58. **Tomita J, Nakajima M, Kondo T, Iwasaki H:** No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation. *Science* 2005, **307**:251-254.
59. **Xu Y, Mori T, Johnson CH:** Circadian clock-protein expression in cyanobacteria: rhythms and phase setting. *Embo J* 2000, **19**:3349-3357.
60. **Kitayama Y, Iwasaki H, Nishiwaki T, Kondo T:** KaiB functions as an attenuator of KaiC phosphorylation in the cyanobacterial circadian clock system. *EMBO J* 2003, **22**:2127-2134.
61. **Kiyohara YB, Katayama M, Kondo T:** A novel mutation in kaiC affects resetting of the cyanobacterial circadian clock. *J Bacteriol* 2005, **187**:2559-2564.
62. **Cohen SE, Erb ML, Selimkhanov J, Dong G, Hasty J, Pogliano J, Golden SS:** Dynamic localization of the cyanobacterial circadian clock proteins. *Curr Biol* 2014, **24**:1836-1844.
63. **Nakajima M, Imai K, Ito H, Nishiwaki T, Murayama Y, Iwasaki H, Oyama T, Kondo T:** Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation *in vitro*. *Science* 2005, **308**:414-415.
64. **Ito H, Kageyama H, Mutsuda M, Nakajima M, Oyama T, Kondo T:** Autonomous synchronization of the circadian KaiC phosphorylation rhythm. *Nat Struct Mol Biol* 2007, **14**:1084-1088.
65. **Teng SW, Mukherji S, Moffitt JR, de Buyl S, O'Shea EK:** Robust circadian oscillations in growing cyanobacteria require transcriptional feedback. *Science* 2013, **340**:737-740.

66. **Hosokawa N, Hatakeyama TS, Kojima T, Kikuchi Y, Ito H, Iwasaki H:** Circadian transcriptional regulation by the posttranslational oscillator without de novo clock gene expression in *Synechococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:15396-15401.
67. **Ditty JL, Canales SR, Anderson BE, Williams SB, Golden SS:** Stability of the *Synechococcus elongatus* PCC 7942 circadian clock under directed anti-phase expression of the *kai* genes. *Microbiology* 2005, **151**:2605-2613.
68. **Murayama Y, Oyama T, Kondo T:** Regulation of circadian clock gene expression by phosphorylation states of KaiC in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* 2008, **190**:1691-1698.
69. **Iwasaki H, Taniguchi Y, Ishiura M, Kondo T:** Physical interactions among circadian clock proteins KaiA, KaiB and KaiC in cyanobacteria. *EMBO J* 1999, **18**:1137-1145.
70. **Egli M, Pattanayek R, Sheehan JH, Xu Y, Mori T, Smith JA, Johnson CH:** Loop-loop interactions regulate KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in the cyanobacterial KaiABC circadian clock. *Biochemistry* 2013, **52**:1208-1220.
71. **Leipe DD, Aravind L, Grishin NV, Koonin EV:** The bacterial replicative helicase DnaB evolved from a RecA duplication. *Genome Res* 2000, **10**:5-16.
72. **Pattanayek R, Xu Y, Lamichhane A, Johnson CH, Egli M:** An arginine tetrad as mediator of input-dependent and input-independent ATPases in the clock protein KaiC. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2014, **70**:1375-1390.
73. **Hayashi F, Suzuki H, Iwase R, Uzumaki T, Miyake A, Shen JR, Imada K, Furukawa Y, Yonekura K, Namba K, et al.:** ATP-induced hexameric ring structure of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *Genes Cells* 2003, **8**:287-296.
74. **Mori T, Saveliev SV, Xu Y, Stafford WF, Cox MM, Inman RB, Johnson CH:** Circadian clock protein KaiC forms ATP-dependent hexameric rings and binds DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:17203-17208.
75. **Pattanayek R, Wang J, Mori T, Xu Y, Johnson CH, Egli M:** Visualizing a circadian clock protein: crystal structure of KaiC and functional insights. *Mol Cell* 2004, **15**:375-388.
76. **Xu Y, Mori T, Pattanayek R, Pattanayek S, Egli M, Johnson CH:** Identification of key phosphorylation sites in the circadian clock protein KaiC by crystallographic and mutagenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:13933-13938.
77. **Nishiwaki T, Iwasaki H, Ishiura M, Kondo T:** Nucleotide binding and autophosphorylation of the clock protein KaiC as a circadian timing process of cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:495-499.
78. **Nishiwaki T, Kondo T:** Circadian autodephosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC occurs via formation of ATP as intermediate. *J Biol Chem* 2012, **287**:18030-18035.
79. **Egli M, Mori T, Pattanayek R, Xu Y, Qin X, Johnson CH:** Dephosphorylation of the core clock protein KaiC in the cyanobacterial KaiABC circadian oscillator proceeds via an ATP synthase mechanism. *Biochemistry* 2012, **51**:1547-1558.
80. **Murakami R, Miyake A, Iwase R, Hayashi F, Uzumaki T, Ishiura M:** ATPase activity and its temperature compensation of the cyanobacterial clock protein KaiC. *Genes Cells* 2008, **13**:387-395.
81. **Terauchi K, Kitayama Y, Nishiwaki T, Miwa K, Murayama Y, Oyama T, Kondo T:** ATPase activity of KaiC determines the basic timing for circadian clock of cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:16377-16381.
82. **Akiyama S:** Structural and dynamic aspects of protein clocks: how can they be so slow and stable? *Cell Mol Life Sci* 2012, **69**:2147-2160.
83. **Murayama Y, Mukaiyama A, Imai K, Onoue Y, Tsunoda A, Nohara A, Ishida T, Maeda Y, Terauchi K, Kondo T, et al.:** Tracking and visualizing the circadian ticking of the cyanobacterial clock protein KaiC in solution. *EMBO J* 2011, **30**:68-78.
84. **Kageyama H, Nishiwaki T, Nakajima M, Iwasaki H, Oyama T, Kondo T:** Cyanobacterial circadian pacemaker: Kai protein complex dynamics in the KaiC phosphorylation cycle *in vitro*. *Mol Cell* 2006, **23**:161-171.

85. Nishiwaki T, Satomi Y, Kitayama Y, Terauchi K, Kiyohara R, Takao T, Kondo T: A sequential program of dual phosphorylation of KaiC as a basis for circadian rhythm in cyanobacteria. *Embo J* 2007, **26**:4029-4037.
86. Rust MJ, Markson JS, Lane WS, Fisher DS, O'Shea EK: Ordered phosphorylation governs oscillation of a three-protein circadian clock. *Science* 2007, **318**:809-812.
87. Nishiwaki T, Satomi Y, Nakajima M, Lee C, Kiyohara R, Kageyama H, Kitayama Y, Temamoto M, Yamaguchi A, Hijikata A, et al.: Role of KaiC phosphorylation in the circadian clock system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:13927-13932.
88. Pattanayek R, Mori T, Xu Y, Pattanayek S, Johnson CH, Egli M: Structures of KaiC circadian clock mutant proteins: a new phosphorylation site at T426 and mechanisms of kinase, ATPase and phosphatase. *PLoS One* 2009, **4**:e7529.
89. Xu Y, Mori T, Qin X, Yan H, Egli M, Johnson CH: Intramolecular regulation of phosphorylation status of the circadian clock protein KaiC. *PLoS One* 2009, **4**:e7509.
90. Kitayama Y, Nishiwaki-Ohkawa T, Sugisawa Y, Kondo T: KaiC intersubunit communication facilitates robustness of circadian rhythms in cyanobacteria. *Nat Commun* 2013, **4**:2897.
91. Nishiwaki-Ohkawa T, Kitayama Y, Ochiai E, Kondo T: Exchange of ADP with ATP in the CII ATPase domain promotes autophosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**:4455-4460.
92. Xu Y, Mori T, Johnson CH: Cyanobacterial circadian clockwork: roles of KaiA, KaiB and the *kaiBC* promoter in regulating KaiC. *Embo J* 2003, **22**:2117-2126.
93. Williams SB, Vakonakis I, Golden SS, LiWang AC: Structure and function from the circadian clock protein KaiA of *Synechococcus elongatus*: a potential clock input mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:15357-15362.
94. Mackey SR, Golden SS, Ditty JL: The itty-bitty time machine genetics of the cyanobacterial circadian clock. *Adv Genet* 2011, **74**:13-53.
95. Kim Y-I, Dong G, Carruthers CW, Jr., Golden SS, LiWang A: The day/night switch in KaiC, a central oscillator component of the circadian clock of cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:12825-12830.
96. Tseng R, Chang YG, Bravo I, Latham R, Chaudhary A, Kuo NW, Liwang A: Cooperative KaiA-KaiB-KaiC Interactions Affect KaiB/SasA Competition in the Circadian Clock of Cyanobacteria. *J Mol Biol* 2014, **426**:389-402.
97. Vakonakis I, LiWang AC: Structure of the C-terminal domain of the clock protein KaiA in complex with a KaiC-derived peptide: implications for KaiC regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:10925-10930.
98. Akiyama S, Nohara A, Ito K, Maéda Y: Assembly and disassembly dynamics of the cyanobacterial periodosome. *Mol Cell* 2008, **29**:703-716.
99. Pattanayek R, Williams DR, Rossi G, Weigand S, Mori T, Johnson CH, Stewart PL, Egli M: Combined SAXS/EM based models of the *S. elongatus* post-translational circadian oscillator and its interactions with the output His-kinase SasA. *PLoS One* 2011, **6**:e23697.
100. Pattanayek R, Williams DR, Pattanayek S, Xu Y, Mori T, Johnson CH, Stewart PL, Egli M: Analysis of KaiA-KaiC protein interactions in the cyano-bacterial circadian clock using hybrid structural methods. *Embo J* 2006, **25**:2017-2028.
101. Brettschneider C, Rose RJ, Hertel S, Axmann IM, Heck AJ, Kollmann M: A sequestration feedback determines dynamics and temperature entrainment of the KaiABC circadian clock. *Mol Syst Biol* 2010, **6**:389.
102. Hayashi F, Itoh N, Uzumaki T, Iwase R, Tsuchiya Y, Yamakawa H, Morishita M, Onai K, Itoh S, Ishiura M: Roles of two ATPase-motif-containing domains in cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *J Biol Chem* 2004, **279**:52331-52337.
103. Chang YG, Kuo NW, Tseng R, LiWang A: Flexibility of the C-terminal, or CII, ring of KaiC governs the rhythm of the circadian clock of cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:14431-14436.

104. **Chang YG, Tseng R, Kuo NW, LiWang A:** Rhythmic ring-ring stacking drives the circadian oscillator clockwise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:16847-16851.
105. **Phong C, Markson JS, Wilhoite CM, Rust MJ:** Robust and tunable circadian rhythms from differentially sensitive catalytic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:1124-1129.
106. **Egli M, Johnson CH:** A circadian clock nanomachine that runs without transcription or translation. *Curr Opin Neurobiol* 2013, **23**:1-9.
107. **Rust MJ, Golden SS, O'Shea EK:** Light-driven changes in energy metabolism directly entrain the cyanobacterial circadian oscillator. *Science* 2011, **331**:220-223.
108. **Johnson CH, Stewart PL, Egli M:** The cyanobacterial circadian system: from biophysics to bioevolution. *Annu Rev Biophys* 2011, **40**:143-167.
109. **van Zon JS, Lubensky DK, Altena PR, ten Wolde PR:** An allosteric model of circadian KaiC phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:7420-7425.
110. **Qin X, Byrne M, Mori T, Zou P, Williams DR, McHaourab H, Johnson CH:** Intermolecular associations determine the dynamics of the circadian KaiABC oscillator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:14805-14810.
111. **Clodong S, Dühring U, Kronk L, Wilde A, Axmann I, Herzel H, Kollmann M:** Functioning and robustness of a bacterial circadian clock. *Mol Syst Biol* 2007, **3**:1-9.
112. **Kageyama H, Kondo T, Iwasaki H:** Circadian formation of clock protein complexes by KaiA, KaiB, KaiC, and SasA in cyanobacteria. *J Biol Chem* 2003, **278**:2388-2395.
113. **Mori T, Williams DR, Byrne MO, Qin X, Egli M, McHaourab HS, Stewart PL, Johnson CH:** Elucidating the ticking of an in vitro circadian clockwork. *PLoS Biol* 2007, **5**:e93.
114. **Emberly E, Wingreen NS:** Hourglass model for a protein-based circadian oscillator. *Phys Rev Lett* 2006, **96**:038303.
115. **Eguchi K, Yoda M, Terada TP, Sasai M:** Mechanism of robust circadian oscillation of KaiC phosphorylation in vitro. *Biophys J* 2008, **95**:1773-1784.
116. **Mutoh R, Nishimura A, Yasui S, Onai K, Ishiura M:** The ATP-mediated regulation of KaiB-KaiC interaction in the cyanobacterial circadian clock. *PLoS One* 2013, **8**:e80200.
117. **Clerico EM, Cassone VM, Golden SS:** Stability and lability of circadian period of gene expression in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Microbiology* 2009, **155**:635-641.
118. **Mihalcescu I, Hsing W, Leibler S:** Resilient circadian oscillator revealed in individual cyanobacteria. *Nature* 2004, **430**:81-85.
119. **Amdaoud M, Vallade M, Weiss-Schaber C, Mihalcescu I:** Cyanobacterial clock, a stable phase oscillator with negligible intercellular coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:7051-7056.
120. **Zwicker D, Lubensky DK, Ten Wolde PR:** Robust circadian clocks from coupled protein-modification and transcription-translation cycles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**:22540-22545.
121. **Nakahira Y, Katayama M, Miyashita H, Kutsuna S, Iwasaki H, Oyama T, Kondo T:** Global gene repression by KaiC as a master process of prokaryotic circadian system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:881-885.
122. **Kitayama Y, Nishiwaki T, Terauchi K, Kondo T:** Dual KaiC-based oscillations constitute the circadian system of cyanobacteria. *Genes Dev* 2008, **22**:1513-1521.
123. **Umetani M, Hosokawa N, Kitayama Y, Iwasaki H:** Hypersensitive photic responses and intact genome-wide transcriptional control without the KaiC phosphorylation cycle in the *Synechococcus* circadian system. *J Bacteriol* 2014, **196**:548-555.
124. **Johnson CH, Egli M, Stewart PL:** Structural insights into a circadian oscillator. *Science* 2008, **322**:697-701.
125. **O'Neill JS, Reddy AB:** Circadian clocks in human red blood cells. *Nature* 2011, **469**:498-503.
126. **O'Neill JS, van Ooijen G, Dixon LE, Troein C, Corellou F, Bouget F-Y, Reddy AB, Millar AJ:** Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature* 2011, **469**:554-558.

127. **Reddy AB, Rey G:** Metabolic and nontranscriptional circadian clocks: eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 2014, **83**:165-189.
128. **Wu L, Reddy AB:** Rethinking the clockwork: redox cycles and non-transcriptional control of circadian rhythms. *Biochem Soc Trans* 2014, **42**:1-10.
129. **Hertel S, Brettschneider C, Axmann IM:** Revealing a two-loop transcriptional feedback mechanism in the cyanobacterial circadian clock. *PLoS Comput Biol* 2013, **9**:e1002966.
130. **Gutu A, O'Shea EK:** Two antagonistic clock-regulated histidine kinases time the activation of circadian gene expression. *Mol Cell* 2013, **50**:288-294.
131. **Paddock ML, Boyd JS, Adin DM, Golden SS:** Active output state of the *Synechococcus* Kai circadian oscillator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:E3849-3857.
132. **Takai N, Nakajima M, Oyama T, Kito R, Sugita C, Sugita M, Kondo T, Iwasaki H:** A KaiC-associating SasA-RpaA two-component regulatory system as a major circadian timing mediator in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:12109-12114.
133. **Ashby MK, Mullineaux CW:** Cyanobacterial *ycf27* gene products regulate energy transfer from phycobilisomes to photosystems I and II. *FEMS Microbiol Lett* 1999, **181**:253-260.
134. **Markson JS, Piechura JR, Puszynska AM, O'Shea EK:** Circadian control of global gene expression by the cyanobacterial master regulator RpaA. *Cell* 2013, **155**:1396-1408.
135. **Taniguchi Y, Takai N, Katayama M, Kondo T, Oyama T:** Three major output pathways from the KaiABC-based oscillator cooperate to generate robust circadian *kaiBC* expression in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010.
136. **Schmitz O, Katayama M, Williams SB, Kondo T, Golden SS:** CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. *Science* 2000, **289**:765-768.
137. **Hanaoka M, Takai N, Hosokawa N, Fujiwara M, Akimoto Y, Kobori N, Iwasaki H, Kondo T, Tanaka K:** RpaB, Another Response Regulator Operating Circadian Clock-dependent Transcriptional Regulation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Journal of Biological Chemistry* 2012, **287**:26321-26327.
138. **Taniguchi Y, Katayama M, Ito R, Takai N, Kondo T, Oyama T:** *labA*: a novel gene required for negative feedback regulation of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *Genes Dev* 2007, **21**:60-70.
139. **Boyd JS, Bordowitz JR, Bree AC, Golden SS:** An allele of the *crm* gene blocks cyanobacterial circadian rhythms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:13950-13955.
140. **Taniguchi Y, Nishikawa T, Kondo T, Oyama T:** Overexpression of *lala*, a paralog of *labA*, is capable of affecting both circadian gene expression and cell growth in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *FEBS Lett* 2012, **586**:753-759.
141. **Xu Y, Weyman PD, Umetani M, Xiong J, Qin X, Xu Q, Iwasaki H, Johnson CH:** Circadian yin-yang regulation and its manipulation to globally reprogram gene expression. *Curr Biol* 2013, **23**:2365-2374.
142. **Axmann IM, Hertel S, Wiegard A, Dörrich AK, Wilde A:** Diversity of KaiC-based timing systems in marine Cyanobacteria. *Mar Genomics* 2014, **14C**:3-16.
143. **Pattanayak G, Rust MJ:** The cyanobacterial clock and metabolism. *Curr Opin Microbiol* 2014, **18**:90-95.
144. **Woelfle MA, Xu Y, Qin X, Johnson CH:** Circadian rhythms of superhelical status of DNA in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:18819-18824.
145. **Yoshida T, Murayama Y, Ito H, Kageyama H, Kondo T:** Nonparametric entrainment of the *in vitro* circadian phosphorylation rhythm of cyanobacterial KaiC by temperature cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:1648-1653.
146. **Mackey SR, Ditty JL, Zeidner G, Chen Y, Golden SS:** Mechanism for entraining the cyanobacterial circadian clock with the environment. In *Bacterial Circadian Programs*. Edited by Ditty JL, Mackey SR, Johnson CH: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg; 2009.
147. **Kim YI, Vinyard DJ, Ananyev GM, Dismukes GC, Golden SS:** Oxidized quinones signal onset of darkness directly to the cyanobacterial circadian oscillator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:17765-17769.

148. **Wood TL, Bridwell-Rabb J, Kim YI, Gao T, Chang YG, LiWang A, Barondeau DP, Golden SS:** The KaiA protein of the cyanobacterial circadian oscillator is modulated by a redox-active cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:5804-5809.
149. **Pattanayek R, Sidiqi SK, Egli M:** Crystal structure of the redox-active cofactor dibromothymoquinone bound to circadian clock protein KaiA and structural basis for dibromothymoquinone's ability to prevent stimulation of KaiC phosphorylation by KaiA. *Biochemistry* 2012, **51**:8050-8052.
150. **Katayama M, Kondo T, Xiong J, Golden SS:** *ldpA* encodes an iron-sulfur protein involved in light-dependent modulation of the circadian period in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Bacteriol* 2003, **185**:1415-1422.
151. **Ivleva NB, Gao T, LiWang AC, Golden SS:** Quinone sensing by the circadian input kinase of the cyanobacterial circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:17468-17473.
152. **Ivleva NB, Bramlett MR, Lindahl PA, Golden SS:** LdpA: a component of the circadian clock senses redox state of the cell. *Embo J* 2005, **24**:1202-1210.
153. **Mackey SR, Choi JS, Kitayama Y, Iwasaki H, Dong G, Golden SS:** Proteins found in a CikA interaction assay link the circadian clock, metabolism, and cell division in *Synechococcus elongatus*. *J Bacteriol* 2008, **190**:3738-3746.
154. **Hosokawa N, Kushige H, Iwasaki H:** Attenuation of the posttranslational oscillator via transcription-translation feedback enhances circadian-phase shifts in *Synechococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:14486-14491.
155. **Nakajima M, Ito H, Kondo T:** *In vitro* regulation of circadian phosphorylation rhythm of cyanobacterial clock protein KaiC by KaiA and KaiB. *FEBS Lett* 2010, **584**:898-902.
156. **Kutsuna S, Kondo T, Aoki S, Ishiura M:** A period-extender gene, *pex*, that extends the period of the circadian clock in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* 1998, **180**:2167-2174.
157. **Kutsuna S, Kondo T, Ikegami H, Uzumaki T, Katayama M, Ishiura M:** The circadian clock-related gene *pex* regulates a negative cis element in the *kaiA* promoter region. *J Bacteriol* 2007, **189**:7690-7696.
158. **Arita K, Hashimoto H, Igari K, Akaboshi M, Kutsuna S, Sato M, Shimizu T:** Structural and biochemical characterization of a cyanobacterium circadian clock-modifier protein. *J Biol Chem* 2007, **282**:1128-1135.
159. **Tanaka H, Kitamura M, Nakano Y, Katayama M, Takahashi Y, Kondo T, Manabe K, Omata T, Kutsuna S:** CmpR is important for circadian phasing and cell growth. *Plant Cell Physiol* 2012, **53**:1561-1569.
160. **Whitton BA, Potts M:** Introduction to the Cyanobacteria. In *Ecology of Cyanobacteria II, Their Diversity in Space and Time*. Edited by Whitton BA: Springer Netherlands; 2012.
161. **Fuchs G:** Oxygene phototrophe Bakterien (Cyanobakterien). In *Allgemeine Mikrobiologie*. Edited by: Georg Thieme Verlag; 2007.
162. **Shih PM, Wu D, Latifi A, Axen SD, Fewer DP, Talla E, Calteau A, Cai F, Tandeau de Marsac N, Rippka R, et al.:** Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:1053-1058.
163. **Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY:** Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 1979, **111**:1-61.
164. **Thompson AW, Foster RA, Krupke A, Carter BJ, Musat N, Vaultot D, Kuypers MM, Zehr JP:** Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga. *Science* 2012, **337**:1546-1550.
165. **Six C, Thomas JC, Garczarek L, Ostrowski M, Dufresne A, Blot N, Scanlan DJ, Partensky F:** Diversity and evolution of phycobilisomes in marine *Synechococcus* spp.: a comparative genomics study. *Genome Biol* 2007, **8**:R259.
166. **NCBI Genome Browse.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>
167. **Armbrust EV, Bowen JD, Olson RJ, Chisholm SW:** Effect of light on the cell cycle of a marine *synechococcus* strain. *Appl Environ Microbiol* 1989, **55**:425-432.

168. **Binder BJ, Chisholm SW:** Relationship between DNA cycle and growth rate in *Synechococcus* sp. strain PCC 6301. *J Bacteriol* 1990, **172**:2313-2319.
169. **Griese M, Lange C, Soppa J:** Ploidy in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2011, **323**:124-131.
170. **Stöckel J, Welsh EA, Liberton M, Kunnvakkam R, Aurora R, Pakrasi HB:** Global transcriptomic analysis of *Cyanothece* 51142 reveals robust diurnal oscillation of central metabolic processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:6156-6161.
171. **Elvitigala T, Stöckel J, Ghosh BK, Pakrasi HB:** Effect of continuous light on diurnal rhythms in *Cyanothece* sp. ATCC 51142. *BMC Genomics* 2009, **10**:226.
172. **Cerveny J, Sinetova MA, Valledor L, Sherman LA, Nedbal L:** Ultradian metabolic rhythm in the diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:13210-13215.
173. **Zinser ER, Lindell D, Johnson ZI, Futschik ME, Steglich C, Coleman ML, Wright MA, Rector T, Steen R, McNulty N, et al.:** Choreography of the transcriptome, photophysiology, and cell cycle of a minimal photoautotroph, *Prochlorococcus*. *PLoS One* 2009, **4**:e5135.
174. **Shi T, Ilikchyan I, Rabouille S, Zehr JP:** Genome-wide analysis of diel gene expression in the unicellular N₂-fixing cyanobacterium *Crocospaera watsonii* WH 8501. *ISME J* 2010, **4**:621-632.
175. **Mohr W, Intermaggio MP, LaRoche J:** Diel rhythm of nitrogen and carbon metabolism in the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Crocospaera watsonii* WH8501. *Environ Microbiol* 2010, **12**:412-421.
176. **Lorne J, Scheffer J, Lee A, Painter M, Miao VP:** Genes controlling circadian rhythm are widely distributed in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2000, **189**:129-133.
177. **Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Mimuro M, Miyashita H, Tsuchiya T, Sasamoto S, Watanabe A, Kawashima K, Kishida Y, et al.:** Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res* 2003, **10**:137-145.
178. **Williams SB:** Speculation and hoopla: Is diversity expected in cyanobacterial circadian timing systems? In *Bacterial Circadian Programs*. Edited by Ditty JL, Mackey SR, Johnson CH: Springer; 2009:19-38.
179. **Axmann IM, Dühring U, Seeliger L, Arnold A, Vanselow JT, Kramer A, Wilde A:** Biochemical evidence for a timing mechanism in *Prochlorococcus*. *J Bacteriol* 2009, **191**:5342-5347.
180. **Baca I, Sprockett D, Dvornyk V:** Circadian input kinases and their homologs in cyanobacteria: evolutionary constraints versus architectural diversification. *Journal of molecular evolution* 2010, **70**:453-465.
181. **Tripp HJ, Bench SR, Turk KA, Foster RA, Desany BA, Niazi F, Affourtit JP, Zehr JP:** Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium. *Nature* 2010, **464**:90-94.
182. **Dvornyk V, Vinogradova O, Nevo E:** Origin and evolution of circadian clock genes in prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:2495-2500.
183. **Wiegand A, Dörrich AK, Deinzer HT, Beck C, Wilde A, Holtzendorff J, Axmann IM:** Biochemical analysis of three putative KaiC clock proteins from *Synechocystis* sp. PCC 6803 suggests their functional divergence. *Microbiology* 2013, **159**:948-958.
184. **Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G:** Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol Rev* 1971, **35**:171-205.
185. **Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, et al.:** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* 1996, **3**:109-136.
186. **Trautmann D, Voss B, Wilde A, Al-Babili S, Hess WR:** Microevolution in cyanobacteria: re-sequencing a motile substrain of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res* 2012, **19**:435-448.
187. **Labarre J, Chauvat F, Thuriaux P:** Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J Bacteriol* 1989, **171**:3449-3457.

188. Mitschke J, Georg J, Scholz I, Sharma CM, Dienst D, Bantscheff J, Voss B, Steglich C, Wilde A, Vogel J, et al.: An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:2124-2129.
189. Yu Y, You L, Liu D, Hollinshead W, Tang YJ, Zhang F: Development of *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory. *Mar Drugs* 2013, **11**:2894-2916.
190. Kopf M, Klähn S, Pade N, Weingartner C, Hagemann M, Voss B, Hess WR: Comparative genome analysis of the closely related *Synechocystis* strains PCC 6714 and PCC 6803. *DNA Res* 2014, **21**:255-266.
191. Aoki S, Kondo T, Ishiura M: Circadian expression of the *dnaK* gene in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* 1995, **177**:5606-5611.
192. Aoki S, Kondo T, Wada H, Ishiura M: Circadian rhythm of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 in the dark. *J Bacteriol* 1997, **179**:5751-5755.
193. Aoki S, Kondo T, Ishiura M: A promoter-trap vector for clock-controlled genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Microbiol Methods* 2002, **49**:265-274.
194. Kucho K-i, Okamoto K, Tsuchiya Y, Nomura S, Nango M, Kanehisa M, Ishiura M: Global analysis of circadian expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* 2005, **187**:2190-2199.
195. Labiosa RG, Arrigo KR, Tu CJ, Bhaya D, Bay S, Grossman AR, Shrager J: Examination of diel changes in global transcript accumulation in *Synechocystis* (Cyanobacteria) 1 *Journal of Phycology* Volume 42, Issue 3. *Journal of Phycology* 2006, **42**:622-636.
196. Aoki S, Onai K: Circadian clocks of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *Thermosynechococcus elongatus*, *Prochlorococcus* spp., *Trichodesmium* spp. and other species. In *Bacterial circadian programs*. Edited by Ditty JL, Mackey SR, Johnson CH: Springer Berlin Heidelberg; 2009:259-282.
197. Dvornyk V, Knudsen B: Functional divergence of the circadian clock proteins in prokaryotes. *Genetica* 2005, **124**:247-254.
198. Cyanobase. <http://genome.microbedb.jp/cyanobase/Synechocystis/map/Chr>
199. Murakami R, Mutoh R, Iwase R, Furukawa Y, Imada K, Onai K, Morishita M, Yasui S, Ishii K, Valencia Swain JO, et al.: The roles of the dimeric and tetrameric structures of the clock protein KaiB in the generation of circadian oscillations in cyanobacteria. *J Biol Chem* 2012, **287**:29506-29515.
200. Villarreal SA, Pattanayek R, Williams DR, Mori T, Qin X, Johnson CH, Egli M, Stewart PL: CryoEM and molecular dynamics of the circadian KaiB-KaiC complex indicates KaiB monomers interact with KaiC and block ATP binding clefts. *J Mol Biol* 2013, **425**:3311-3324.
201. Egli M: Intricate Protein-Protein Interactions in the Cyanobacterial Circadian Clock. *J Biol Chem* 2014, **289**:21267-21275.
202. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ: Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1982, **1**:945-951.
203. Snijder J, Burnley RJ, Wiegard A, Melquiond AS, Bonvin AM, Axmann IM, Heck AJ: Insight into cyanobacterial circadian timing from structural details of the KaiB-KaiC interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**:1379-1384.
204. Loza-Correa M, Sahr T, Rolando M, Daniels C, Petit P, Skarina T, Gomez Valero L, Dervins-Ravault D, Honore N, Savchenko A, et al.: The *Legionella pneumophila* kai operon is implicated in stress response and confers fitness in competitive environments. *Environ Microbiol* 2014, **16**:359-381.
205. Hitomi K, Oyama T, Han S, Arvai AS, Getzoff ED: Tetrameric architecture of the circadian clock protein KaiB. A novel interface for intermolecular interactions and its impact on the circadian rhythm. *J Biol Chem* 2005, **280**:19127-19135.
206. Thain A, Gaston K, Jenkins O, Clarke AR: A method for the separation of GST fusion proteins from co-purifying GroEL. *Trends in Genetics* 1996, **12**:209-210.
207. Dörrich AK, Mitschke J, Siadat O, Wilde A: Deletion of the *Synechocystis* sp. PCC 6803 *kaiAB1C1* gene cluster causes impaired cell growth under light-dark conditions. *Microbiology* 2014.

208. **Kim HW, Vannela R, Zhou C, Rittmann BE:** Nutrient acquisition and limitation for the photoautotrophic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803 as a renewable biomass source. *Biotechnol Bioeng* 2011, **108**:277-285.
209. **Lopo M, Montagud A, Navarro E, Cunha I, Zille A, de Cordoba PF, Moradas-Ferreira P, Tamagnini P, Urchueguia JF:** Experimental and modeling analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803 growth. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2012, **22**:71-82.
210. **Foster JS, Singh AK, Rothschild LJ, Sherman LA:** Growth-phase dependent differential gene expression in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and regulation by a group 2 sigma factor. *Arch Microbiol* 2007, **187**:265-279.
211. **Myers J, Graham JR, Wang RT:** Light Harvesting in *Anacystis nidulans* Studied in Pigment Mutants. *Plant Physiol* 1980, **66**:1144-1149.
212. **Beck C, Hertel S, Rediger A, Lehmann R, Wiegand A, Kölsch A, Heilmann B, Georg J, Hess WR, Axmann IM:** A daily expression pattern of protein-coding genes and small non-coding RNAs in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Appl Environ Microbiol* 2014.
213. **Wallner T, Hagiwara Y, Bernát G, Sobotka R, Reijerse EJ, Frankenberg-Dinkel N, Wilde A:** Inactivation of the conserved open reading frame ycf34 of *Synechocystis* sp. PCC 6803 interferes with the photosynthetic electron transport chain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2012, **1817**:2016-2026.
214. **Sarrrouilhe D, Filhol O, Leroy D, Bonello G, Baudry M, Chambaz EM, Cochet C:** The tight association of protein kinase CK2 with plasma membranes is mediated by a specific domain of its regulatory β -subunit. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1998, **1403**:199-210.
215. **Sobotka R, McLean S, Zuberova M, Hunter CN, Tichy M:** The C-terminal extension of ferrochelatase is critical for enzyme activity and for functioning of the tetrapyrrole pathway in *Synechocystis* strain PCC 6803. *J Bacteriol* 2008, **190**:2086-2095.
216. **Boehm M, Nield J, Zhang P, Aro EM, Komenda J, Nixon PJ:** Structural and mutational analysis of band 7 proteins in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* 2009, **191**:6425-6435.
217. **Hermann R, Walther P, Muller M:** Immunogold labeling in scanning electron microscopy. *Histochem Cell Biol* 1996, **106**:31-39.
218. **Pattanayek R, Williams DR, Pattanayek S, Mori T, Johnson CH, Stewart PL, Egli M:** Structural model of the circadian clock KaiB-KaiC complex and mechanism for modulation of KaiC phosphorylation. *EMBO J* 2008, **27**:1767-1778.
219. **Heck AJ:** Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology. *Nat Methods* 2008, **5**:927-933.
220. **Zhang H, Cui W, Gross ML, Blankenship RE:** Native mass spectrometry of photosynthetic pigment-protein complexes. *FEBS Lett* 2013, **587**:1012-1020.
221. **van den Heuvel RH, Heck AJ:** Native protein mass spectrometry: from intact oligomers to functional machineries. *Curr Opin Chem Biol* 2004, **8**:519-526.
222. **Benesch JL:** Collisional activation of protein complexes: picking up the pieces. *J Am Soc Mass Spectrom* 2009, **20**:341-348.
223. **van Duijn E:** Current limitations in native mass spectrometry based structural biology. *J Am Soc Mass Spectrom* 2010, **21**:971-978.
224. **Rosati S, Rose RJ, Thompson NJ, van Duijn E, Damoc E, Denisov E, Makarov A, Heck AJR:** Etablierung eines Orbitrap-Analysators zur Charakterisierung von intakten Antikörpern mittels nativer Massenspektrometrie. *Angewandte Chemie* 2012, **124**:13166-13170.
225. **Hernandez H, Robinson CV:** Determining the stoichiometry and interactions of macromolecular assemblies from mass spectrometry. *Nat Protoc* 2007, **2**:715-726.
226. **Zhang H, Liu H, Niedzwiedzki DM, Prado M, Jiang J, Gross ML, Blankenship RE:** Molecular mechanism of photoactivation and structural location of the cyanobacterial orange carotenoid protein. *Biochemistry* 2014, **53**:13-19.

227. **Pattanayek R, Williams DR, Pattanayek S, Xu Y, Mori T, Johnson CH, Stewart PL, Egli M:** Crystal Structure of Full Length Circadian Clock Protein KaiC with Correct Geometry at Phosphorylation Sites. Edited by.
228. **Pattanayek R, Yadagiri KK, Ohi MD, Egli M:** Nature of KaiB-KaiC binding in the cyanobacterial circadian oscillator. *Cell Cycle* 2013, **12**:810-817.
229. **Mikkat S, Fulda S, Hagemann M:** A 2D gel electrophoresis-based snapshot of the phosphoproteome in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Microbiology* 2014, **160**:296-306.
230. **Iwase R, Imada K, Hayashi F, Uzumaki T, Morishita M, Onai K, Furukawa Y, Namba K, Ishiura M:** Functionally important substructures of circadian clock protein KaiB in a unique tetramer complex. *J Biol Chem* 2005, **280**:43141-43149.
231. **Mercado-Pimentel ME, Jordan NC, Aisemberg GO:** Affinity purification of GST fusion proteins for immunohistochemical studies of gene expression. *Protein Expr Purif* 2002, **26**:260-265.
232. **Samuelson JC:** Recent developments in difficult protein expression: a guide to *E. coli* strains, promoters, and relevant host mutations. *Methods Mol Biol* 2011, **705**:195-209.
233. **Schlegel S, Rujas E, Ytterberg AJ, Zubarev RA, Luirink J, de Gier JW:** Optimizing heterologous protein production in the periplasm of *E. coli* by regulating gene expression levels. *Microb Cell Fact* 2013, **12**:24.
234. **Morello E, Bermudez-Humaran LG, Llull D, Sole V, Miraglio N, Langella P, Poquet I:** *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008, **14**:48-58.
235. **Terpe K:** Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, **72**:211-222.
236. **Cyano Express.** cyanoexpress.sysbiolab.eu
237. **Knoop H, Gründel M, Zilliges Y, Lehmann R, Hoffmann S, Lockau W, Steuer R:** Flux balance analysis of cyanobacterial metabolism: the metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS Comput Biol* 2013, **9**:e1003081.
238. **Matallana-Surget S, Derock J, Leroy B, Badri H, Deschoenmaecker F, Wattiez R:** Proteome-wide analysis and diel proteomic profiling of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* PCC 8005. *PLoS One* 2014, **9**:e99076.
239. **Cervený J, Nedbal L:** Metabolic Rhythms of the Cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142 Correlate with Modeled Dynamics of Circadian Clock. *J Biol Rhythms* 2009, **24**:295-303.
240. **Stöckel J, Jacobs JM, Elvitigala TR, Liberton M, Welsh EA, Polpitiya AD, Gritsenko MA, Nicora CD, Koppelaar DW, Smith RD, et al.:** Diurnal rhythms result in significant changes in the cellular protein complement in the cyanobacterium *Cyanothece* 51142. *PLoS One* 2011, **6**:e16680.
241. **Guerreiro AC, Benevento M, Lehmann R, van Breukelen B, Post H, Giansanti P, Altelaar AF, Axmann IM, Heck AJ:** Daily rhythms in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* probed by high-resolution mass spectrometry based proteomics reveals a small-defined set of cyclic proteins. *Mol Cell Proteomics* 2014.
242. **Lehmann R, Machne R, Georg J, Benary M, Axmann I, Steuer R:** How cyanobacteria pose new problems to old methods: challenges in microarray time series analysis. *BMC Bioinformatics* 2013, **14**:133.
243. **Straub C, Quillardet P, Vergalli J, de Marsac NT, Humbert JF:** A day in the life of *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806 as revealed by a transcriptomic analysis. *PLoS One* 2011, **6**:e16208.
244. **Waldbauer JR, Rodrigue S, Coleman ML, Chisholm SW:** Transcriptome and proteome dynamics of a light-dark synchronized bacterial cell cycle. *PLoS One* 2012, **7**:e43432.
245. **Garczarek L, Partensky F, Irlbacher H, Holtzendorff J, Babin M, Mary I, Thomas JC, Hess WR:** Differential expression of antenna and core genes in *Prochlorococcus* PCC 9511 (Oxyphotobacteria) grown under a modulated light-dark cycle. *Environ Microbiol* 2001, **3**:168-175.
246. **Holtzendorff J, Partensky F, Jacquet S, Bruyant F, Marie D, Garczarek L, Mary I, Vaultot D, Hess WR:** Diel expression of cell cycle-related genes in synchronized cultures of *Prochlorococcus* sp. strain PCC 9511. *J Bacteriol* 2001, **183**:915-920.

247. **Bruyant F, Babin M:** Diel variations in the photosynthetic parameters of *Prochlorococcus* strain PCC 9511: Combined effects of light and cell cycle. *Limnol. Oceanogr.* 2005, **50**:850-863.
248. **Partensky F, Blanchot J, Lantoine F, Neveux J, Marie D:** Vertical structure of picophytoplankton at different trophic sites of the tropical northeastern Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res* 1996, **43**:1191-1213.
249. **Bruyant F, Babin M, Sciandra A, Marie D, Genty B, Claustre H, Blanchot J, Bricaud A, Rippka R, Boulben S, et al.:** An axenic cyclostat of *Prochlorococcus* PCC 9511 with a simulator of natural light regimes. *Journal of Applied Phycology* 2001, **13**:135-142.
250. **Liu H, Nolla HA, Campbell L:** *Prochlorococcus* growth rate and contribution to primary production in the equatorial and subtropical North Pacific Ocean. *Aquat Microb Ecol* 1997, **12**:39-47.
251. **Mary I, Garczarek L, Tarran GA, Kolowrat C, Terry MJ, Scanlan DJ, Burkill PH, Zubkov MV:** Diel rhythmicity in amino acid uptake by *Prochlorococcus*. *Environ Microbiol* 2008, **10**:2124-2131.
252. **Claustre H, Bricaud A, Babin M, Bruyant F, Guillou L, Le Gall F, Marie D, Partensky F:** Diel variations in *Prochlorococcus* optical properties. *Limnol. Oceanogr.* 2002, **47**:1637-1647.
253. **Gründel M, Scheunemann R, Lockau W, Zilliges Y:** Impaired glycogen synthesis causes metabolic overflow reactions and affects stress responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* 2012, **158**:3032-3043.
254. **Wilde A, Lunser K, Ossenhuhl F, Nickelsen J, Borner T:** Characterization of the cyanobacterial ycf37: mutation decreases the photosystem I content. *Biochem J* 2001, **357**:211-216.
255. **Wilde A, Mikolajczyk S, Alawady A, Lokstein H, Grimm B:** The *gun4* gene is essential for cyanobacterial porphyrin metabolism. *FEBS Lett* 2004, **571**:119-123.
256. **Huege J, Krall L, Steinhauser MC, Giavalisco P, Rippka R, Tandeau de Marsac N, Steinhauser D:** Sample amount alternatives for data adjustment in comparative cyanobacterial metabolomics. *Anal Bioanal Chem* 2011, **399**:3503-3517.
257. **Lea-Smith DJ, Ross N, Zori M, Bendall DS, Dennis JS, Scott SA, Smith AG, Howe CJ:** Thylakoid terminal oxidases are essential for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to survive rapidly changing light intensities. *Plant Physiol* 2013, **162**:484-495.
258. **Srivastava A, Rai, AN, Neilan, BA:** *Stress Biology of Cyanobacteria*: CRC Press; 2013.
259. **Lepp PW, Schmidt TM:** Nucleic acid content of *synechococcus* spp. during growth in continuous light and light/dark cycles. *Arch Microbiol* 1998, **170**:201-207.
260. **Xu Y, Ma P, Shah P, Rokas A, Liu Y, Johnson CH:** Non-optimal codon usage is a mechanism to achieve circadian clock conditionality. *Nature* 2013, **495**:116-120.
261. **Bourne HR, Sanders DA, McCormick F:** The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991, **349**:117-127.
262. **Kopf M, Klahn S, Scholz I, Matthiessen JK, Hess WR, Voss B:** Comparative Analysis of the Primary Transcriptome of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res* 2014.
263. **Aryal UK, Stockel J, Krovvidi RK, Gritsenko MA, Monroe ME, Moore RJ, Koppelaar DW, Smith RD, Pakrasi HB, Jacobs JM:** Dynamic proteomic profiling of a unicellular cyanobacterium *Cyanothece* ATCC51142 across light-dark diurnal cycles. *BMC Syst Biol* 2011, **5**:194.
264. **UTR Designer.** http://sbi.postech.ac.kr/utr_designer
265. **Seo SW, Yang J-S, Kim I, Yang J, Min BE, Kim S, Jung GY:** Predictive design of mRNA translation initiation region to control prokaryotic translation efficiency. *Metabolic Engineering* 2013, **15**:67-74.
266. **Norling B, Zak E, Andersson B, Pakrasi H:** 2D-isolation of pure plasma and thylakoid membranes from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett* 1998, **436**:189-192.
267. **Zhang P, Battchikova N, Jansen T, Appel J, Ogawa T, Aro EM:** Expression and functional roles of the two distinct NDH-1 complexes and the carbon acquisition complex NdhD3/NdhF3/CupA/Sll1735 in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell* 2004, **16**:3326-3340.
268. **Bölter B, Soll J, Schulz A, Hinnah S, Wagner R:** Origin of a chloroplast protein importer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:15831-15836.

269. **Westphal S, Heins L, Soll J, Vothknecht UC:** Vippl deletion mutant of *Synechocystis*: a connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:4243-4248.
270. **Tusnady GE, Simon I:** Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J Mol Biol* 1998, **283**:489-506.
271. **Tusnady GE, Simon I:** The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 2001, **17**:849-850.
272. **HMMTOP.** <http://www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html>
273. **Predict Protein Open.** <http://ppopen.informatik.tu-muenchen.de>
274. **Srivastava R, Pisareva T, Norling B:** Proteomic studies of the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics* 2005, **5**:4905-4916.
275. **Liberton M, Howard Berg R, Heuser J, Roth R, Pakrasi HB:** Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Protoplasma* 2006, **227**:129-138.
276. **van de Meene AM, Hohmann-Marriott MF, Vermaas WF, Roberson RW:** The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch Microbiol* 2006, **184**:259-270.
277. **Pisareva T, Kwon J, Oh J, Kim S, Ge C, Wieslander A, Choi JS, Norling B:** Model for membrane organization and protein sorting in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 inferred from proteomics and multivariate sequence analyses. *J Proteome Res* 2011, **10**:3617-3631.
278. **Mullineaux CW, Sarcina M:** Probing the dynamics of photosynthetic membranes with fluorescence recovery after photobleaching. *Trends Plant Sci* 2002, **7**:237-240.
279. **Nevo R, Charuvi D, Shimoni E, Schwarz R, Kaplan A, Ohad I, Reich Z:** Thylakoid membrane perforations and connectivity enable intracellular traffic in cyanobacteria. *Embo j* 2007, **26**:1467-1473.
280. **Mazouni K, Domain F, Cassier-Chauvat C, Chauvat F:** Molecular analysis of the key cytokinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE. *Mol Microbiol* 2004, **52**:1145-1158.
281. **Asato Y:** Toward an understanding of cell growth and the cell division cycle of unicellular photoautotrophic cyanobacteria. *Cell Mol Life Sci* 2003, **60**:663-687.
282. **Sherman DM, Troyan TA, Sherman LA:** Localization of Membrane Proteins in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942 (Radial Asymmetry in the Photosynthetic Complexes). *Plant Physiol* 1994, **106**:251-262.
283. **Agarwal R, Maralihal G, Sudarsan V, Choudhury SD, Vatsa RK, Pal H, Melzer M, Sainis JK:** Differential distribution of pigment-protein complexes in the Thylakoid membranes of *Synechocystis* 6803. *J Bioenerg Biomembr* 2012, **44**:399-409.
284. **Agarwal R, Matros A, Melzer M, Mock HP, Sainis JK:** Heterogeneity in thylakoid membrane proteome of *Synechocystis* 6803. *J Proteomics* 2010, **73**:976-991.
285. **NCBI GeneBank.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>,
286. **Xu W, Chen H, He CL, Wang Q:** Deep sequencing-based identification of small regulatory RNAs in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* 2014, **9**:e92711.
287. **Sharp PM, Li WH:** The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* 1987, **15**:1281-1295.
288. **JCat - java Codon Adaptation Tool.** <http://www.jcat.de>,
289. **Gaudana SB, Alagesan S, Chetty M, Wangikar PP:** Diurnal rhythm of a unicellular diazotrophic cyanobacterium under mixotrophic conditions and elevated carbon dioxide. *Photosynth Res* 2013, **118**:51-57.
290. **Camsund D, Lindblad P:** Engineered transcriptional systems for cyanobacterial biotechnology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2014, **2**.
291. **Klumpp S, Zhang Z, Hwa T:** Growth Rate-Dependent Global Effects on Gene Expression in Bacteria. *Cell* **139**:1366-1375.

292. **Gao F, Luo H, Zhang CT:** DoriC 5.0: an updated database of oriC regions in both bacterial and archaeal genomes. *Nucleic Acids Res* 2013, **41**:D90-93.
293. **Gao F, Zhang CT:** Ori-Finder: a web-based system for finding oriCs in unannotated bacterial genomes. *BMC Bioinformatics* 2008, **9**:79.
294. **DoriC.** <http://tubic.tju.edu.cn/doric/index.php>,
295. **Gao F, Zhang CT:** Origins of replication in *Cyanothece* 51142. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:E125; author reply E126-127.
296. **Zhou Y, Chen WL, Wang L, Zhang CC:** Identification of the oriC region and its influence on heterocyst development in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Microbiology* 2011, **157**:1910-1919.
297. **Sauer N:** Analyse cyanobakterieller KaiC-Proteine. Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Biologie, Bachelorarbeit 2012.
298. Sambrook J, Russell DW: *Molecular cloning: a laboratory manual* edn 3. Cold Spring Harbor, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
299. **Lennox ES:** Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* 1955, **1**:190-206.
300. **Tartoff KD, Hobbs CA:** Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Research Laboratories Focus* 1987, **9**.
301. **Houmard J, de Marsac NT:** Cyanobacterial genetic tools: current status. *Methods Enzymol* 1988, **167**:808-847.
302. **Inoue H, Nojima H, Okayama H:** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 1990, **96**:23-28.
303. **Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H:** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986, **51 Pt 1**:263-273.
304. **Oligo Calc.** <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>
305. **Hanahan D:** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983, **166**:557-580.
306. **Wang W, Malcolm BA:** Two-stage polymerase chain reaction protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions, and insertions, using QuikChange site-directed mutagenesis. *Methods Mol Biol* 2002, **182**:37-43.
307. **Tartoff K. D. HCA:** Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Research Laboratories Focus* 1987, **9**.
308. **Bensadoun A, Weinstein D:** Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem* 1976, **70**:241-250.
309. **Bradford MM:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
310. **Laemmli UK:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, **227**:680-685.
311. **Schägger H, von Jagow G:** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987, **166**:368-379.
312. **Kyhse-Andersen J:** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984, **10**:203-209.
313. **Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA:** An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* 1979, **100**:95-97.
314. **ExPASy-ProtParam.** <http://web.expasy.org/protparam/>
315. **NCBI.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

316. **NCBI Standard Protein Blast (blastn).**
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
317. **NCBI Standard Nucleotide Blast (blastn).**
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
318. **Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R:** A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* 2010, **38**:W695-699.
319. **Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, et al.:** Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 2011, **7**:539.
320. **Clustal Omega.** <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
321. **Nicholas KB, Nicholas HB, Jr, Deerfield DWI:** GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW NEWS* 1997, **4**:14.

Abkürzungsverzeichnis

% C	Vernetzungsgrad von Acrylamid und Biacrylamid
% T	Gesamt-Polyacrylamidkonzentration
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
A, C, G, T	Nukleinbasen der DNA
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C6B6	Komplex aus einem KaiC-Hexamer und sechs KaiB-Monomeren
C6B1	Komplex aus einem KaiC-Hexamer und einem KaiB-Monomer
ca.	circa
Ci	Curie
CikA	<i>circadian input kinase A</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Crm	<i>circadian rhythmicity modulator</i>
CT	Circadian Zeit (engl. <i>circadian time</i>)
D	Aspartat
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DD	Kultivierung in Dunkelheit nach vorheriger Synchronisation durch 12h:12h Licht-Dunkelrhythmen
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholsäure Natriumsalz
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
engl.	englisch
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (lat. und andere)
fg	Femtogramm
g	Gravitationsbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDX	Wasserstoff-Deuterium-Austausch
HDX-MS	Wasserstoff-Deuterium-Austausch mit anschließender Massenspektrometrie
His- <i>tag</i>	Polyhistidin- <i>tag</i>
IM-MS	Ionen-Mobilitäts-Massenspektrometrie
IPTG	Isopropyl-thio-β-D-Galactopyranosid
KaiA ₆₈₀₃	KaiA aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
KaiA ₇₉₄₂	KaiA aus <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942
KaiB ₇₉₄₂	KaiB aus <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942
KaiB _{BP-1}	KaiB aus <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1
KaiB _{lpp}	KaiB aus <i>Legionella pneumophila</i> str. Paris
KaiB _{MED4}	KaiB aus <i>Prochlorococcus marinus</i> MED4
KaiC3-AA	KaiC3-Variante, in der die Hauptphosphorylierungsstellen gegen zwei Alaninreste ausgetauscht sind

KaiC3-DE	KaiC3-Variante, in der die Hauptphosphorylierungsstellen gegen Aspartat und Glutamat ausgetauscht sind
KaiC ₇₉₄₂	KaiC aus <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942
KaiC ₇₉₄₂ -AA	KaiC ₇₉₄₂ -Variante, in der die Hauptphosphorylierungsstellen gegen zwei Alaninreste ausgetauscht sind
KaiC ₇₉₄₂ -ET	KaiC ₇₉₄₂ -Variante, in der S431 gegen Glutamat ausgetauscht ist
KaiC _{BP-1}	KaiC aus <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1
KaiC _{MED4}	KaiC aus <i>Prochlorococcus marinus</i> MED4
KaiCp/T	vollständig dephosphoryliertes KaiC
KaiCpS/pT	doppelt phosphoryliertes KaiC
KaiCpS/T	Serin-phosphoryliertes KaiC
KaiCS/pT	Threonin-phosphoryliertes KaiC
kb	Kilobasen
kd	Kilodalton
l	Liter
LabA	<i>low-amplitude and bright</i>
LalA	<i>labA-like A</i>
lat.	lateinisch
LD	12h:12h Licht-Dunkelrhythmen
ldpA	<i>light dependent period</i>
LL	Kultivierung in Dauerlicht nach vorheriger Synchronisation durch 12h:12h Licht-Dunkelrhythmen
M	molar
Mbp	Megabasenpaare
mg	Milligramm
min	Minute
mRNA	messenger RNA
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
nm	Nanometer
NP-KaiC	Nicht-phosphoryliertes KaiC

Nr.	Nummer
OCP	<i>orange carotinoid protein</i>
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
OriC	Replikationsursprung (engl. <i>Origin of replication</i>)
PAA	Polyacrylamid
PAA-Gel	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCC	<i>Pasteur Culture Collection</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
Pex	Period extender
pg	Picogramm
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PSII	Photosystem II
P-KaiC	Phosphoryliertes KaiC
PTO	Posttranslationaler Oszillator
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RpaA	<i>regulator of phycobilisome association/associated A</i>
RpaB	<i>regulator of phycobilisome association/associated B</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-qRT-PCR	<i>reverse transcription quantitative real time PCR</i>
S	Serin
s. u.	siehe unten
SasA	<i>synechococcus adaptive sensor</i>

SAXS	<i>small angle x-ray scattering</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sp.	Spezies
sRNA	kleine (nicht-kodierende) RNA
<i>Synechococcus</i>	<i>Synechococcus elongatus PCC 7942</i>
<i>Synechocystis</i>	<i>Synechocystis sp. PCC 6803</i>
T	Threonin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	Tris buffered Saline mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TES	Tris(hydroxymethyl)methylaminoethansulfonsäure
TRIS	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan
TTFL	Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife (engl. <i>transcriptional translational feedback loop</i>)
U	Unit
ü. N.	über Nacht
ÜNK	Übernacht-Kultur
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenteil pro Gesamtvolumen
VE-Wasser	voll entsalztes Wasser
w/v	Massenanteil pro Gesamtvolumen
z. B.	zum Beispiel
ZT	Zeitgeberzeit (engl. <i>zeitgeber time</i>)

Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei meinem äußerst hilfsbereiten Doktorvater Wolfgang Lockau bedanken, dass ich dieses Thema unter ausgiebiger Nutzung seiner hervorragend ausgestatteten Räumlichkeiten am Institut für Biologie bearbeiten durfte.

Mein größter Dank gilt Ilka Maria Axmann für ihre herausragende Betreuung. Mit ihrer einzigartigen Gabe die Welt (der Wissenschaft) stets entspannt und gut gelaunt zu betrachten, hat sie mir auch in schleppenden Phasen immer wieder Motivation eingehaucht. Danke für das Interesse an meiner Arbeit und die vielen spannenden Diskussionen, die zahlreichen Möglichkeiten, aber auch die Ruhe und das in mich gesetzte Vertrauen.

Zudem geht ein herzliches Dankeschön an meine wunderbaren (ehemaligen) Kollegen in der Biochemie und im bacnets-Team. Die unzähligen Gespräche im Flur oder auf dem Hof, die gemütlichen Mittagessen im Pausenraum und lustigen Cocktailabende aber auch die wenigen Versuche mal den Badminton-Schläger zu schwingen, werde ich nie vergessen.

Darüber hinaus möchte ich mich für eure unzähligen Ratschläge und die fortwährende Hilfe bei praktischen Problemen bedanken. Sabine, Marianne und Thomas, ihr sollt hier besonders hervorgehoben werden. Antje, vielen lieben Dank für die tägliche Unterstützung seit Beginn des Studiums!!

Danke an Anne, Christian, Stefanie, Michi, Reimo, Beate, Adrian, Tim und Ilka für die Bereitschaft der eigenen circadianen Uhr immer wieder ein Schnippchen zu schlagen, um durch die unzähligen 48h *Samplings* mehr über jene der Cyanos zu erfahren. Stefanie und Christian, Danke für den gedanklichen Austausch zur circadianen Uhr und die Beantwortung meiner immer wieder kehrenden mathematischen Fragen.

Ein lieber Dank geht auch an Luiza. Die gemeinsame Etablierung der Proteinquantifizierungen und freundschaftliche Zusammenarbeit hat mir besonders viel Spaß bereitet.

Nancy danke ich für ihre engagierte Unterstützung im Rahmen ihrer Bachelorarbeit.

Diese Arbeit wurde durch erfolgreiche Kooperationen bereichert. Darum möchte ich Anja K. Dörrich, Julia Holtzendorff und Annegret Wilde herzlich für die perfekte Zusammenarbeit danken. Many Thanks to Joost Snijder, Rebecca Burnley and Albert J.R. Heck for the kind

collaboration and fruitful work on *Synechococcus* Kai proteins. I would like to thank Dennis J. Nürnberg, Giulia Mastroianni and Conrad M. Mullineaux for introducing me to the TEM technique. Many thanks for your help and the very pleasant stay in London. In diesem Zusammenhang auch nochmal vielen Dank an Ilka, für die Möglichkeit unsere Kooperationspartner zu besuchen und zudem viele spannende Konferenzen zu bereisen.

Auch meinen neuen Kollegen danke ich für die mir entgegengebrachte Geduld und die Möglichkeit diese Arbeit zu beenden. Danke an Jan-Philipp und Mariam, die mich im Rahmen ihres Studiums bereits voller Motivation bei Folgeprojekten unterstützten.

Schlussendlich bedanke ich mich herzlichst bei MuP, Franzi, Kathy, Julia, (erneut) Antje, Fabi, Franzi und Thomas für ihre fortwährende Unterstützung. Dennis, Danke für das Korrekturlesen vieler Seiten, deine unendliche Geduld, Ironie und den Rückhalt.

Publikationsliste

Zeitschriftenartikel

Wiegard, A, Dörrich, AK, Deinzer, HT, Beck, C, Wilde, A, Holtzendorff, J, Axmann, IM: Biochemical analysis of three putative KaiC clock proteins from *Synechocystis* sp. PCC 6803 suggests their functional divergence. *Microbiology* 2013, **159**, 948-958.

Snijder, J, Burnley, RJ, Wiegard, A, Melquiond, AS, Bonvin, AM, Axmann, IM, Heck, AJ: Insight into cyanobacterial circadian timing from structural details of the KaiB-KaiC interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**(4): 1379-1384.

Beck, C, Hertel, S, Rediger, A, Lehmann, R, Wiegard, A, Kölsch, A, Heilmann, B, Georg, J, Hess, WR, Axmann, IM: A daily expression pattern of protein-coding genes and small non-coding RNAs in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Appl Environ Microbiol* 2014, **80**(17): 5195-5206

Axmann, IM, Hertel, S, Wiegard, A, Dörrich, AK & Wilde, A: Diversity of KaiC-based timing systems in marine Cyanobacteria. *Marine genomics* 2014, **14C**, 3-16. *Übersichtsartikel*

Konferenz-Vorträge

Wiegard, A, Dörrich, AK, Beck, C, Hertel, S, Wilde, A, Axmann, IM: *Synechocystis* sp. PCC 6803 a representative expressing multiple clock protein homologs. *Gemeinsame Konferenz der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie* (05.10. - 08.10.2014) in Dresden (Deutschland)

Wiegard, A, Axmann, IM: Diversity of circadian clock protein homologs in Cyanobacteria. *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a representative for having multiple Kai proteins. *3rd Annual PRIME-XS meeting* (23.10. - 25.10.2013) in Split (Kroatien)

Konferenz-Poster

Wiegard, A, Dörrich, AK, Beck, C, Hertel, S, Wilde, A, Axmann, IM: *Synechocystis* sp. PCC 6803 a representative expressing multiple clock protein homologs. *9th European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria* (07.09. - 11.09.2014) in Texel (Niederlande)

Wiegard, A, Dörrich, AK, Deinzer, HT, Beck, C, Seeliger, L, Wilde, A, Holtzendorff, J, Axmann, IM: Biochemical analyses of the multiple KaiC proteins from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *ESF-EMBO Symposium - Molecular Bioenergetics of Cyanobacteria: Shaping The Environment* (15.04 – 20.4.2013) in Pultusk (Polen)

Wiegard, A, Dörrich, AK, Holtzendorff, J, Wilde, A, Axmann, IM: Multiple circadian clock proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803? *14th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes* (05.08. - 10.08.2012) in Porto (Portugal)

Wiegard, A, Dörrich, AK, Seeliger, L, Wilde, A, Axmann, IM: Non-standard circadian clock systems in cyanobacteria. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie* (18.03. - 21.03.2012) in Tübingen (Deutschland)

Wiegard, A, Georg, J, Wilde, A, Hess, WR Axmann, IM: Non-standard circadian clock systems in cyanobacteria. *ESF-EMBO Symposium - Molecular Bioenergetics of Cyanobacteria: From Cell to Community* (10. - 15.04.2011) in Sant Feliu de Guixols (Spanien)

Berlin, den 11.2.2015

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht. Die dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 11.2.2015

Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Version dieser Arbeit nicht veröffentlicht.

Curriculum vitae

Der Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Version dieser Arbeit nicht veröffentlicht.